



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

TESE DE DOUTORADO

PERFIL DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T DE PACIENTES COM
MELOPATIA ASSOCIADA AO VÍRUS LINFOTRÓPICO DAS CÉLULAS T
HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)/ PARAPARESIA TROPICAL ESPÁSTICA
(HAM/TSP) POSSÍVEL, PROVÁVEL E DEFINIDO

RAIMUNDO COUTINHO JUNIOR

Salvador – Brasil

2013

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**PERFIL DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T DE PACIENTES COM
MIELOPATIA ASSOCIADA AO VÍRUS LINFOTRÓPICO DAS CÉLULAS T
HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)/ PARAPARESIA TROPICAL ESPÁSTICA
(HAM/TSP) POSSÍVEL, PROVÁVEL E DEFINIDO**

RAIMUNDO COUTINHO JUNIOR

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Fernanda Rios Grassi
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
para a obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Brasil

2013

Raimundo Coutinho Junior

CPqGM

**PERFIL DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T DE PACIENTES COM MIELOPATIA ASSOCIADA AO
VÍRUS LINFOTRÓPICO DAS CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)/ PARAPARESIA
TROPICAL ESPÁSTICA (HAM/TSP) POSSÍVEL, PROVÁVEL E DEFINIDO**

2013

**PERFIL DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS T DE PACIENTES COM
MIELOPATIA ASSOCIADA AO VIRUS LINFOTROPICO DAS CELULAS T
HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)/ PARAPARESIA TROPICAL ESPÁSTICA
(HAM/TSP) POSSÍVEL, PROVÁVEL E DEFINIDO**

RAIMUNDO COUTINHO JUNIOR

Folha de Aprovação

Comissão Examinadora

FONTES DE FINANCIAMENTO

FAPESB

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Esse trabalho primeiramente pertence a vocês, meus pais, pois sem dúvida alguma este trabalho é um dos frutos de seu trabalho de adubação, aeração e cuidado com uma de suas árvores do pomar. Se não fosse seu trabalho árduo embaixo de sol a sol, esta árvore nunca teria frutificado como ocorreu. Sem vocês eu seria apenas mais um arbusto retorcido e desprovido de frutos. Desde sempre agradeço a existência de vocês dois, Raimundo e Waldina em minha singela vida. Além disso, não poderia esquecer de você meu querido irmão Fábio que sempre foi um grande companheiro para todas as horas.

A minha Família,

Sem vocês dois, eu nada seria. Desde o princípio, o meio e o fim vocês sempre estão na frente. Sem vocês dois, meus amores, eu de fato já estaria perdido no vale dos desolados. Este trabalho foi feito para vocês dois: à Adriana, minha esposa, amiga e companheira, e para Theo, meu querido e amado filho. Desejo-lhes sempre tudo de melhor.

À Fernanda Grassi,

“Toutes les grandeurs de ce monde ne valent pás un bon ami.”

Depois de ler essa citação de Voltaire, só pude lembrar de ti: “Todas as riquezas do mundo não valem mais que um bom amigo”.

Esta citação vale muito mais do que o som das palavras que esta frase nos faz sentir e pensar. Durante, essa quase uma década ao seu lado, aprendi mais do que técnicas de pesquisas, mas do um objeto de estudo. Durante esses anos, aprendi a respeitar-te cada vez mais e mais como minha norteadora. Você foi o meu exemplo de conduta no caminho da ciência. Tenho certeza, que suas sugestões nunca me permitiram estar *déboussolé*. Continue assim, norteadora como uma bússola a vida daqueles que estão ao seu redor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos pacientes do centro de HTLV-1, pois, sem eles de nada serviria este trabalho.

À Fernanda Grassi, minha querida orientadora, pela oportunidade, pela confiança, pelo aprendizado científico, obrigado por tudo.

Ao Dr. Bernardo Galvão, pela oportunidade de trabalhar no CHTLV, fazer parte de sua equipe.

Ao Dr. Mitermayer por sempre estar disposto a ajudar em tudo que fosse necessário.

À coordenação de ensino pela excelente trabalho.

À Viviana Olavarria, amiga do peito, pelo companheirismo e amizade que me ajudou durante esses anos de Mestrado e Doutorado.

A Rita Elizabeth minha co-Orientadora pelo carinho, atenção.

Aos colegas e verdadeiros amigos do LASP:

As meus eternos companheiros de trabalho do P2 Luana, Mauricio, Joana e Marcus, que me ajudaram nas eternas jornadas de trabalho.

A D. Maria Eugenia (D. Lindinha), Jurema, Claudio e Rita funcionários do LASP:que sempre me acolheram, me ajudaram e sempre estiveram dispostos a fazer o melhor.

Aos membros da plataforma de citometria de fluxo: Jorge Clarencio, Liliane e Micely pela ajuda.

À D. Fiscina, D. Lia e a Martha pela de ajuda na biblioteca do CPqGM.

A Dra Maria de Lourdes Nascimento, minha primeira e querida orientadora, minha primeira bússola. Obrigado pelos primeiros passos da pesquisa científica.

A Regina Carneiro, obrigado por toda sua ajuda e atenção.

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.

Mahatma Gandhi

RESUMO

COUTINHO JUNIOR. Raimundo. **Perfil de ativação dos linfócitos T de pacientes com mielopatia associada ao vírus linfotrópico das células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) / paraparesia tropical espástica (HAM/TSP) possível, provável e definido.** Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

O vírus linfotrópico das células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é o agente etiológico da mielopatia associada ao HTLV / paraparesia espástica tropical (HAM / TSP), que ocorre em menos de 5 % dos indivíduos infectados. A resposta imune controla parcialmente a infecção, porém pode estar ligada a patogênese da doença. O objetivo deste estudo foi caracterizar fenotipicamente as subpopulações de linfócitos T, em pacientes assintomáticos e com diagnóstico de HAM/TSP. Foram avaliados 103 pacientes acompanhados no Centro de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) e 19 controles não infectados. Os pacientes foram categorizados de acordo com o grau de certeza do diagnóstico de HAM/TSP: possível (Ps), provável (Pb) e definido (D), além de pacientes assintomáticos (ASS). O perfil fenotípico (CD25, CD45RA, CD45RO, HLA-DR, CD25, CCR-7, CD62L) das subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ e a expressão da proteína Tax de FoxP3 na subpopulação T CD4+ foram avaliados por citometria de fluxo. A carga proviral do HTLV foi quantificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. As proporções dos linfócitos TCD4⁺HLA-DR⁺ e TCD8⁺HLA-DR foram significativamente maiores nos pacientes com HAM/TSP Ps, Pb e D comparados aos controles não infectados (p=0,003). Comparando-se o grupo de infectados, as proporções de linfócitos TCD4+ e TCD8+ expressando HLA-DR foram significativamente maiores em pacientes com HAM/TSP-Ps e D comparados a pacientes assintomáticos (p<0,0001). Além disso, houve uma correlação positiva entre porcentagem de linfócitos T CD4+ HLA-DR+ e a carga proviral (r=0,5, p=0,0003). As proporções de linfócitos T CD4+CD25+ foram maiores nos pacientes com HAM/TSP D comparados aos controles não infectados. Observou-se um aumento na proporção de células reguladoras (T CD4+FOXP3+) nos indivíduos assintomáticos e nos pacientes com HAM/TSP-D comparados a indivíduos não infectados (p=0,04). A carga proviral HTLV-1 foi maior no grupo de pacientes HAM/TSP-D do que em pacientes assintomáticos (p=0,0001). Observa-se uma diferença estatística entre a proporção de células CD4⁺TAX⁺ dos indivíduos assintomáticos (0,26%) e os pacientes HAM/TSP-Ps (5,26%) (p=0,04). Em conclusão, os pacientes com HAM/TSP Ps, Pb e D apresentam um perfil fenotípico de ativação celular, comparados aos controles não infectados. Além disso, os pacientes com HAM/TSP Pb e D apresentam maior expressão de HLA-DR nas subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+, comparados aos assintomáticos, indicando um perfil imunológico semelhante nestes dois subgrupos de pacientes.

Palavras chave: HTLV, carga proviral, HAM/TSP, linfócitos T CD4+, ativação.

ABSTRACT

COUTINHO JUNIOR. Raimundo. **Activation profile of T-lymphocytes from patients with lymphotropic virus-associated myelopathy human T cell type 1 (HTLV-1) / tropical spastic paraparesis (HAM / TSP) possible, probable and definite.** Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

The human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of HTLV-associated myelopathy/ Tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), which occurs in less than 5% of the infected individuals. The immune response partially controls the infection, but may be linked to the pathogenesis of disease. The aim of this study was to characterize phenotypically T lymphocyte subpopulations in asymptomatic and in patients diagnosed with HAM/TSP. We evaluated 103 patients treated at the center for HTLV of Bahia School of Medicine and Public Health (EBMSP) and 19 uninfected controls. Patients were categorized as asymptomatic and according to the degree of certainty of the diagnosis of HAM/TSP: Possible (Ps), Probable (Pb) and Definite (D). The phenotypic profile (CD25, CD45RA, CD45RO, HLA-DR, CCR-7, CD62L) subpopulation of CD4⁺ and CD8⁺ T Cells and expression of the protein Tax and Foxp3 in the subpopulation CD4⁺ T cells were evaluated by flow cytometry. The HTLV proviral load was quantified by polymerase chain reaction (PCR) in real time. The proportions of CD4⁺ and CD8⁺ expressing HLA-DR⁺ were significantly higher in patients ($p < 0.0001$). In addition there were a correlation between CD4⁺ HLA-DR⁺ or CD8⁺ HLA-DR⁺ and the proviral load ($R = 0,5; p < 0,0001$). The proportions of CD4⁺CD25⁺ were higher in patients with HAM/TSP D compared to infected controls. There was an increased proportion of regulatory cells (CD4⁺Foxp3⁺) of asymptomatic individuals and patients HAM/TSP D, compared to the uninfected individuals ($p = 0.04$).

. There is a statistical difference between the proportion of CD4⁺TAX⁺ asymptomatic individuals (0.26%) patients and HAM/TSP-Ps (5.26%) ($p = 0.04$). In conclusion, patients with HAM/TSP Ps, Pb and D exhibit a phenotypic profile of cell activation, compared to uninfected controls. In addition, patients with HAM/TSP Pb and D show higher expression of HLA -DR in subpopulations of T lymphocytes CD4⁺ and CD8⁺ T cells, compared to asymptomatic, indicating an immunological profile similar in both groups of patients .

Keywords: HTLV, proviral load, HAM/TSP, T CD4⁺ lymphocytes, activation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do HTLV-1.	15
Figura 2. Diagrama esquemático do Genoma do HTLV-1.....	16
Figura 3. Estratégia metodológica aplicada no estudo.....	27
Figura 4. Estratégia para identificação dos marcadores de ativação das subpopulações de linfócitos T. .	30
Figura 5. Estratégia para identificação da subpopulação de células T CD4+ naive, memória centra (TCM) e memória efetora (TEM).	31
Figura 6. Estratégia para identificação da subpopulação de células T CD4+FoxP3+.	32
Figura 7. Estratégia para identificação da subpopulação de células T CD4+TAX+.	33
Figura 8. Equação para o cálculo da carga proviral do HTLV-1.....	33
Figura 9. Distribuição da carga proviral entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1	36
Figura 10. Frequência da população de linfócitos T CD4+.....	36
Figura 11. Proporção de linfócitos T CD4+/CD25+ (A) e T CD4+/HLA-DR+ (B)	37
Figura 12. Proporção de linfócitos T memória CD4+/CD45RO+ (A), linfócitos T naïve CD4+/CD45RO+ (B), memória central CD45RO+/CCR7+/CD62L+ (C).....	39
Figura 13. Proporçãode linfócitos T CD4+FoxP3+.....	40
Figura 14. Proporção de linfócitos T CD4+TAX+	41
Figura 15. Frequência e a correlação da população de linfócitos T CD8+	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios da OMS para o diagnóstico da HAM/TSP.	21
Tabela 2. Critérios de diagnóstico da HAM/TSP segundo os critérios de De Castro Costa.	22
Tabela 3. Imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos analisadas no estudo.	29
Tabela 4. Dados demográficos dos indivíduos incluídos no estudo.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ATLL	Leucemia/Linfoma de células T do adulto
CCR7	Molécula de adesão
CD4	Molécula que se expressa na superfície de células T auxiliares e monócitos
CD45RA	Marcador celular encontrado em células T naive.
CD45RO	Marcador celular encontrada em células de memória
CD62L	L Selectina relacionada a migração para os sítios primários
CD8	Marcador de células T citotóxicas
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DMSO	Dimetilsulfóxido
ENV	Gene que codifica as proteínas do envelope do HTLV
FOXP3	Forkheadbox P3
GAG	Gene que codifica as proteínas estruturais do HTLV
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV/ Paraparesia tropical espástica
HLA	Antígeno humano leucocitário
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano-DR (Human leukocyteantigen-DR).
HTLV-1	Vírus Linfotrópico das células T humanas do tipo-1
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Pheripheral Blood Mononuclear Cell/ Células mononucleares do sangue periférico
POL	Gene do HTLV
TAX	Proteína trasactivadora do HTLV-1
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
WHO	Word Health Organization

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	15
1.1 VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1).....	15
1.2 RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO HTLV-1.....	18
1.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA HAM/TSP	20
1.3.1. Imunopatogênese da HAM/TSP.....	23
1.4 MARCADORES DE PROGRESSÃO DAS DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1	24
2. OBJETIVOS	26
2.1. GERAL.....	26
2.2. ESPECÍFICOS	26
3 PACIENTES E MÉTODOS	27
3.1 ÁREA E POPULAÇÃO DE ESTUDO	28
3.2. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)	28
3.3 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DO PERFIL DA POPULAÇÃO DOS LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO.	29
3.4 DETECÇÃO INTRACELULAR DE FOXP3.....	31
3.5 DETECÇÃO INTRACELULAR DE TAX.....	32
3.6 EXTRAÇÃO DO DNA E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL	33
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4 RESULTADOS	35
4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES.....	35
4.2 AVALIAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1	35
4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺	36

4.2.1	<i>Proporção dos linfócitos T CD4+FoxP3+</i>	40
4.2.2	<i>Avaliação da expressão da proteína TAX em linfócitos T CD4+</i>	40
4.3	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8+	41
4.3.1	<i>Avaliação da proporção da ativação de linfócitos T CD8+</i>	41
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXOS	60
	Anexo 1-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	60
	Anexo 2- Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load is associated with activation of T-lymphocytes in HTLV-1-infected asymptomatic individuals.....	63

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)

O primeiro retrovírus humano a ser identificado foi isolado no início da década de 1980, quando Robert Gallo e seus colaboradores isolaram o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1) a partir de células de um paciente com linfoma cutâneo de células T (POIESZ *et al.*, 1980). Pesquisadores japoneses descreveram uma leucemia encontrada predominantemente no Sudeste do Japão, denominada de leucemia de células T do adulto (ATL) (UCHIYAMA *et al.*, 1977) e posteriormente um retrovírus foi isolado de células de pacientes com este tipo de leucemia e denominado de vírus da leucemia de células T do adulto (ATLV) (HINUMA, 1982). Análises comparativas dos isolados ATLV e HTLV demonstraram tratar-se de um mesmo vírus, o HTLV-1 (WATANABE *et al.*, 1984).

O HTLV-2, foi identificado em 1982, numa linhagem de células T imortalizadas de um paciente com tricoleucemia (KALYANARAMAN *et al.*, 1982). Mais de vinte anos depois, foram isolados outros tipos virais descritos como HTLV-3 e HTLV-4 de indivíduos na África Central (WOLFE *et al.*, 2005).

O HTLV-1 pertence a família Retroviridae, sub família Orthoretrovirinae, Gênero Deltaretrovirus. Trata-se de um vírus envelopado, que apresenta as proteínas de superfície (gp46) e transmembranares (gp21), codificadas pelo gene env (Figura 1). Seu capsídeo, de forma icosaédrica, é composto pelas proteínas p15, p24 e p19, codificadas pelo gene gag. O capsídeo abriga o genoma viral composto por duas fitas simples de RNA, e as enzimas transcriptase reversa e integrase (YOSHIDA, 2001).

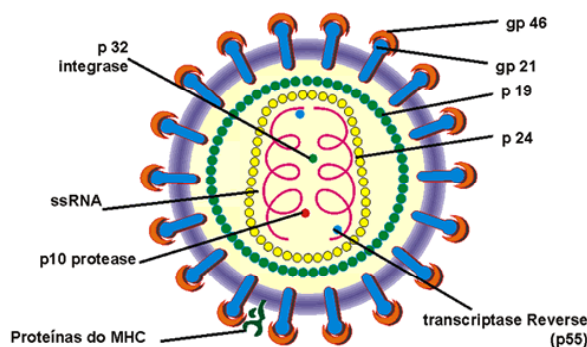


Figura 1. Estrutura do HTLV-1.

O genoma do HTLV-1 (**Figura 2**), como todos os retrovírus, contém os genes estruturais gag, pol e env flanqueados por duas regiões repetidas, chamadas de LTR (*long terminal repeats*). Existem quatro fases de leitura abertas (ORFs) I, II, III e IV localizadas na região 3'LTR. As ORFs III e IV codificam os genes regulatórios tax e rex e os genes acessórios p12/p8 codificados pela ORF I e p30/p13 codificados pela ORF II. Recentemente, uma nova proteína viral foi identificada, o fator de leucina zíper (HBZ) codificada pela ORF que se localiza entre os genes env e tax/rex (HIVIN *et al.*, 2004).

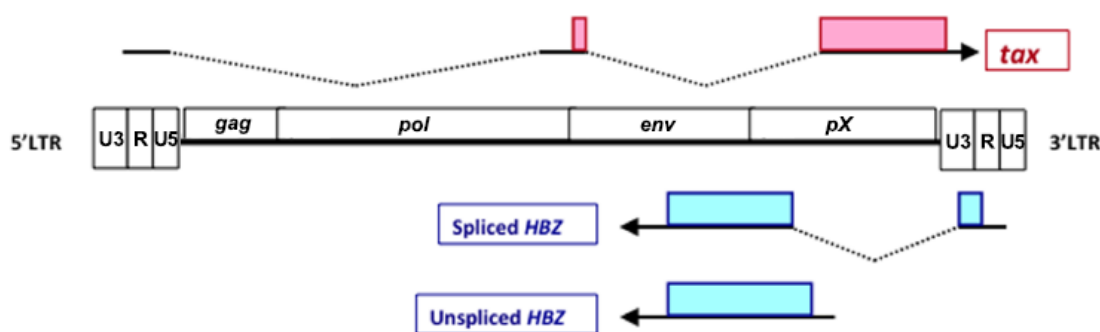


Figura 2. Diagrama esquemático do Genoma do HTLV-1

A proteína viral TAX é um ativador da transcrição do HTLV-1 a partir da LTR, e tem funções múltiplas como: ativar ou reprimir a transcrição de alguns genes celulares, inibir proteínas supressoras de tumores, alterar o ciclo celular e reprimir genes supressores da apoptose e do reparo do DNA. TAX pode influenciar a expressão de genes que relacionados com a proliferação celular como os protooncogenese: c-fos, c-myc e erg, os genes de citocinas e seus receptores: interleucina (IL) IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-2R α , fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator estimulante de colônias de macrófago-granulócitos (GM-CSF), fator transformador de crescimento β (TGF- β), proteína relacionada ao hormônio de paratireoide (PTHrP), vimentina (proteína do citoesqueleto), moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), fator nuclear κ de células B (NF- κ B) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (FRANCHINI *et al.*, 1984). A proteína TAX pode estar implicada na patogênese das doenças associadas ao HTLV-1, como será discutido posteriormente.

Rex é outra importante proteína regulatória que atua nos eventos pós-transcricionais dos principais genes virais. Rex favorece a tradução dos RNAm que não sofrem processamento (*unspliced*) Gag/Pro/Pol, os que sofrem um único processamento

(*single spliced*) Env, e os que sofrem dois processamentos (*doublespliced*) TAX e Rex (FRANCHINI *et al.*, 1984).

Trabalhos recentes apontam a importância da proteína HBZ (MATSUOKA GREEN, 2009). Essa proteína foi primeiramente descrita em pacientes com linfoma leucemia de células T do Adulto (ATLL) induzindo o aumento da proliferação celular além de estar relacionada com aspectos importantes da patogênese da leucemia (ARNOLD *et al.*, 2006; SATOU, 2012). Na HAM/TSP, a expressão de HBZ está associada com o aumento da carga proviral e a gravidade da doença. (SAITO *et al.*, 2009; USUI *et al.*, 2008).

Existem quatro proteínas virais acessórias: p12, p27, p13 e p30 que são igualmente implicadas no desenvolvimento de doenças associadas ao HTLV-1. Estas proteínas podem contribuir para maior infectividade viral, aumento da carga proviral, ativação das células do hospedeiro e regulação da transcrição gênica. A proteína p12 localiza-se no retículo endoplasmático ligando-se as proteínas calreticulina e calnexina (BINDHU *et al.*, 2004). A p12 associa-se às cadeias do complexo principal de histocompatibilidade (HLA) de classe I diminuindo a expressão destas moléculas na superfície celular, favorecendo assim o escape do vírus ao reconhecimento por linfócitos T CD8+ citotóxicos. Outra função importante da p12 é promover a ativação de linfócitos T por aumentar a produção de IL-2, como descrito nas células T de linhagem (Jurkat) e em linfócitos primários (BINDHU *et al.*, 2004).

Em relação às doenças associadas a infecção pelo HTLV-1, inicialmente, o vírus foi associada ao desenvolvimento da leucemia/ linfoma de células T de adulto ATLL (Adult T-cell leukemia/lymphoma-ATL) (POIESZ *et al.*, 1980). O HTLV-1 é reconhecido igualmente como o agente etiológico de uma síndrome neurológica denominada mielopatia associada ao HTLV/ paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e da uveíte associada ao HTLV (GESSAIN, 2012; MOCHIZUKI *et al.*, 1996) e da dermatite infectiva (LA GRENADE, 1996). Além disso, a infecção pelo HTLV-1 está associada a doenças inflamatórias, incluindo artrites (IJICHI *et al.*, 1993), polimiosites (MORGAN *et al.*, 1989) e a Síndrome de Sjögren (EGUCHI *et al.*, 1992; EGUCHI *et al.*, 1995) e ceratoconjuntivite seca (MERLE *et al.*, 1999; MERLE *et al.*, 1994). Uma maior prevalência de doenças infecciosas como strongiloidíase (GOTUZZO *et al.*, 1996; NAKADA *et al.*, 1984), escabiose (BLAS *et al.*, 2005; BRITES *et al.*, 2002) e tuberculose em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (VERDONCK *et al.*, 2007) têm sido encontrada em indivíduos infectados pelo HTLV-1 comparados aos não infectados.

Estima-se entre 10 a 20 milhões o número de indivíduos infectados pelo HTLV-1, a maior parte deles agrupados em regiões do Japão, Caribe, África e América Latina. O Brasil tem o maior número absoluto de indivíduos infectados (GESSAIN, 2012). Assim como em outros locais do mundo, no Brasil, a prevalência da infecção pelo HTLV-1 varia consideravelmente em diferentes localidades e em diferentes grupos (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005). Um estudo multicêntrico realizado em doadores de sangue no Brasil envolvendo cinco capitais de quatro regiões, estimou uma prevalência de 1,38% para esta infecção em Salvador como a maior do país (GALVAO-CASTRO *et al.*, 1997). É importante ressaltar que, além da Bahia, outros estados como o Pará e o Maranhão apresentam elevadas taxas de prevalência, maior que 9/1000 indivíduos doadores de sangue (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005). No ano de 2003, Dourado e colaboradores publicaram um estudo de base populacional que estimou a prevalência do HTLV-1 em Salvador em cerca 1,8% (DOURADO *et al.*, 2003). Este mesmo estudo também revelou características epidemiológicas observadas em outras localidades do mundo, como o aumento da prevalência com a idade e a maior frequência desta em mulheres. No grupo com idade acima de 50 anos a prevalência de infecção por HTLV-1 é de cerca de 10% em mulheres e 8% em homens. Além disso, Dourado e colaboradores (2003) também revelaram a maior frequência desta infecção em indivíduos com baixa renda.

As principais vias de transmissão do HTLV-1 são a sexual; a vertical, em especial pelo aleitamento materno e a via parenteral, através do compartilhamento de seringas e agulhas por usuários de drogas injetáveis e hemoderivados (MANNIS *et al.*, 1992; URETA-VIDAL *et al.*, 1999)

1.2 RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

Sabe-se que o HTLV-1 infecta preferencialmente linfócitos TCD4+ de memória (CD45RO) e promove uma infecção crônica e persistente. Outras células também são alvo do HTLV-1 como células dendríticas, macrófagos, linfócitos B e linfócitos TCD8+ (CHEN *et al.*, 1983; RICHARDSON *et al.*, 1990; YAMANO *et al.*, 2004) (DE REVEL *et al.*, 1993; KNIGHT *et al.*, 1993). O HTLV-1 promove a proliferação espontânea de linfócitos T CD4+, T CD8+, e células NK (MASCARENHAS *et al.*, 2006; NORRIS *et al.*, 2010; PRINCE *et al.*, 1995)

Uma resposta imune humoral e celular é desencadeada em resposta a infecção viral, porém ela é pouco efetiva para o controle da infecção. O papel da resposta imune humoral não está claramente estabelecido. Elevados títulos de anticorpos estão relacionados à elevada carga proviral e ao desenvolvimento HAM/TSP (BANGHAM, 2005). Sabe-se que esta resposta é inicialmente direcionada a proteína Gag. Após alguns meses de infecção, os anticorpos específicos são dirigidos contra as proteínas do envelope viral e à proteína TAX (KANNAGI et al., 1991; PARKER et al., 1992; ELOVAARA et al., 1993; PIQUE et al., 1996).

Uma resposta celular é mediada por linfócitos T CD4⁺ auxiliares (Th) e T CD8⁺ citotóxicos (CTL) específicos para peptídeos virais. As células Th do tipo 1 produzem citocinas pró-inflamatórias como interferon (IFN), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina (IL) 1. As células T CD4⁺ Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 e são responsáveis pela ativação e produção de anticorpos pelos linfócitos (TR *et al.*, 1986).

Durante a fase crônica da infecção pelo HTLV-1, os CTL mantêm-se cronicamente ativados em resposta ao vírus. Eles reconhecem epítopos específicos da proteína regulatória TAX do HTLV expressos em células T CD4⁺, o alvo dominante da ação destas células. Em menor proporção ocorre o reconhecimento aos epítopos em Gag, Env e Pol. Entretanto, esta resposta além de destruir as células infectadas pelo vírus, pode contribuir para o dano tecidual resultante da resposta inflamatória. Níveis elevados de CTL no sangue periférico, no líquido e no infiltrado da medula de pacientes com HAM/TSP e a ausência de forte resposta CTL específica, especialmente CTL anti-TAX, em indivíduos assintomáticos, reforçam a ideia da contribuição destes linfócitos na patogênese da HAM/TSP (BARMAK *et al.*, 2003.; BIDDISON *et al.*, 1997). Por outro lado, outros autores sugerem que CTL pode ter um papel fundamental na redução da carga proviral do HTLV-1, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias, como HAM/TSP (HANON, 2002).

Outros fatores do hospedeiro como o haplótipo HLA influenciam na progressão da doença (BARMAK *et al.*, 2003). Estudos mostraram que indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 que expressam HLA-A*2 e/ou HLA-Cw*08, têm uma menor carga proviral e um menor risco de desenvolver HAM/TSP (JEFFERY *et al.*, 2000; JEFFERY *et al.*, 1999). Ou seja, a presença ou ausência desses alelos podem influenciar a carga proviral em indivíduos infectados ou com manifestações clínicas, como

HAM/TSP, artrite, uveíte e acometimento pulmonar (JEFFERY *et al.*, 1999; SUGIMOTO *et al.*, 1993; YAKOVA *et al.*, 2005).

1.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA HAM/TSP

Como exposto anteriormente, o HTLV-1 está reconhecidamente associado ao desenvolvimento de ATLL, HAM/TSP e uveíte. Embora essas doenças sejam descritas, a maioria dos indivíduos infectados (95-98 %) permanece assintomática. No entanto, este clássico conceito está sendo revisto em estudos recentes, demonstrando que os pacientes assintomáticos para estas patologias apresentam outras manifestações neurológicas (POETKER *et al.*, 2011), alterações urinárias e disfunção erétil que podem estar relacionadas à uma mielopatia inicial (CASKEY *et al.*, 2007; POETKER *et al.*, 2011)

A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica e progressiva que acomete segmentos torácico e lombar da medula espinhal (YOSHIOKA *et al.*, 1993) É mais frequente em mulheres na quarta década de vida. Caracteriza-se como uma doença debilitante por uma mielopatia lentamente progressiva, tendo como consequência a paraparesia dos membros inferiores (OSAME *et al.* 2002; OSAME *et al.*, 1988). Anormalidades sensoriais periféricas, dor lombar persistente, hiperreflexia, disfunção da bexiga e do intestino e impotência sexual são outros sinais relacionados à doença. A prevalência da HAM/TSP é de 1 a 5 % em pacientes infectados pelo vírus, sendo considerada uma doença rara (KAPLAN *et al.*, 1990). O diagnóstico da HAM/TSP é baseado nos critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), estabelecidos em 1989 (Tabela 1). Estes critérios incluem uma extensa lista de sinais e sintomas, além de exames complementares como avaliação do líquido cefalorraquidiano a fim de confirmar a etiologia viral, além de exames de imagem. Assim, a HAM/TSP é um diagnóstico de exclusão, pois outras causas de mielopatia devem ser excluídas. Estes exames podem ser de difícil realização em países de recursos limitados.

Tabela 1. Critérios da OMS para o diagnóstico da HAM/TSP.

Adaptado: OMS, 1989

I. Critérios clínicos

O quadro clínico florido de paraparesia espástica crônica não é primeiramente apresentado pelo paciente.

Um único sintoma ou sinal físico pode ser a única evidência de início de HAM/TSP.

A. Incidência por idade e sexo

Mais frequentemente esporádica em adultos. Às vezes familiar, ocasionalmente visto em crianças; predominante em mulheres.

B. Instalação

Geralmente insidioso, mas pode ser súbita.

C. Principais manifestações neurológicas

1. Paraparesia espástica crônica que normalmente progride de forma lenta, às vezes permanece inalterada após progressão inicial.
2. A fraqueza dos membros inferiores, de predomínio proximal.
3. Distúrbio vesical geralmente é uma característica precoce. Constipação intestinal ocorre mais tardiamente; impotência ou diminuição da libido são frequentes.
4. Sintomas sensoriais como formigamento, agulhadas, queimação, etc. são mais proeminentes que sinais físicos objetivos.
5. Dor lombar baixa com irradiação para membros inferiores é comum.
6. Sensibilidade vibratoria é frequentemente comprometida que proprioceptiva.
7. Hiperreflexia dos membros inferiores, frequentemente com o clônus e sinal de Babinski.
8. Hiperreflexia de membros superiores; sinais Hoffmann e de Tromner frequentes; a fraqueza pode estar ausente.
9. Reflexo mandibular exagerado em alguns pacientes.

D. Achados neurológicos menos frequentes

Sinais cerebelares, atrofia óptica, surdez, nistagmo, déficits de outros de nervos cranianos, tremores de mão; ausente ou diminuição do reflexo de aquileu.

Crises convulsivas, comprometimento cognitivo, demência ou comprometimento da consciência são raros.

E. outras manifestações neurológicas que podem ser associadas com HAM/TSP

Atrofia muscular, fasciculações (raras), polimiosite, neuropatia periférica, poliradiculopatia, neuropatia craniana, meningite, encefalopatia.

F. Manifestações não neurológicas sistêmicas podem ser associadas com HAM/TSP

Alveolite pulmonar, uveíte, síndrome de Sjögren, artropatia, vasculite, Ictiose, crioglobulinemia, gamopatia monoclonal, leucemia/linfoma de células T do adulto.

II. Diagnóstico laboratorial

- A. presença de anticorpos de HTLV-1 ou antígenos no sangue e no líquido cefalorraquidiano (LCR).
- B. LCR pode mostrar pleocitose linfocitária moderada.
- C. Linfócitos lobulados podem estar presentes no sangue e/ou LCR.
- D. Pode ocorrer hiperproteinorraquia leve a moderada no LCR.
- E. Isolamento viral quando possível no sangue e/ou LCR.

Em 2006, um grupo de pesquisadores liderados por De Castro-Costa, estabeleceram novos critérios para o diagnóstico da HAM/TSP baseados no status clínico dos pacientes, uma vez que, frequentemente, existe a suspeita desta manifestação, mas não há o preenchimento de todos os critérios determinados pela OMS (DE CASTRO-COSTA *et al.*, 2006). Após realizar uma revisão na literatura para determinar a frequência com a qual cada item das diretrizes da OMS era citado na descrição de casos clínicos, os autores propuseram uma nova classificação, denominado Critérios de Belém, com três níveis de diagnóstico de acordo ao grau de certeza em relação ao estabelecimento da HAM/TSP: possível, provável e definitivo (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios de diagnóstico da HAM/TSP segundo os critérios de De Castro Costa.

Diagnóstico de HAM/TSP	Descrição
Definido	Paraparesia espástica progressiva não remissiva e incapacitante, suficiente para ser percebida pelo paciente. Sintomas sensitivos podem ou não estar presentes. Quando presentes, permanecem de forma sutil e sem nível sensitivo. Sinais ou sintomas dos esfíncteres anal e urinário podem ou não estar presentes. Presença de Anticorpos anti-HTLV-1 no soro ou líquido confirmado por western blot e/ou PCR positivo para HTLV-1 no sangue periférico e/ou líquido;
Provável	Apresentação monossintomática: espasticidade ou hiperreflexia nos membros inferiores ou sinal de Babinski com ou sem sinais sensitivos leves ou bexiga neurogênica isolada confirmada por teste urodinâmico; Presença de Anticorpos anti-HTLV-1 no soro ou líquido confirmado por western blot e/ou PCR positivo para HTLV-1 no sangue periférico e/ou líquido; Exclusão de outras doenças que poderiam se assemelhar a HAM/TSP
Possível	Apresentação clínica completa ou incompleta; Presença de Anticorpos anti-HTLV-1 no soro ou líquido confirmado por western blot e/ou PCR positivo para HTLV-1 no sangue periférico e/ou líquido; Não exclusão de outras condições que se assemelham à HAM/TSP.

Adaptado: De Castro Costa, 2006

1.3.1. Imunopatogênese da HAM/TSP

O desencadeamento de uma resposta inflamatória crônica e a desmielinização da medula espinhal torácica, ou mais raramente cervical, são os principais eventos da patogênese da HAM/TSP.

Três hipóteses são propostas para explicar a destruição da mielina resultando na HAM/TSP: a citotoxicidade direta, a autoimunidade e o efeito *bystander* (NAKAMURA, 2000; OSAME, 2002; TAYLOR, 1998)

A citotoxicidade direta diz respeito a capacidade do sistema imunológico identificar e destruir as células infectadas pelo vírus, principalmente as células infectadas do sistema nervoso central como oligodendrócitos, neurônios e astrócitos, que expressam em sua superfície antígenos virais. Desse modo, os linfócitos TCD8+ atravessariam a barreira hemato-encefálica contribuindo para o dano tecidual resultante da resposta inflamatória. O papel das células citotóxicas pode ser evidenciado devido à alta proporção dessas células no sangue periférico, no líquido e nas regiões onde existem lesão da medula espinhal em pacientes com HAM/TSP (ASQUITH *et al.*, 2005; IZUMO, 2010).

A segunda hipótese, a autoimunidade, diz respeito ao mimetismo entre proteínas virais e antígenos próprios da medula, que levariam a um estado de autoimunidade. Pode-se citar as riboproteínas nucleares hnRNP-A1 e hnRNP-A1^B, que apresentaram reação cruzada com anticorpos anti-TAX. Ou seja, as células TCD4 ao atravessarem a barreira hemato-encefálica encontrariam uma célula neuronal e a reconheceria como uma célula infectada, resultando na lise da célula neuronal não infectada.

Por último, o efeito *bystander* poderia ser explicado pela migração de linfócitos TCD4+ infectados pelo HTLV-1 e de linfócitos TCD8+ específicos de epítopos virais- através da barreira hemato-encefálica. As células da glia seriam destruídas pelo efeito das citocinas pro-inflamatórias liberados pelos CTL contra as células TCD4+ infectadas. De fato, parece que os três mecanismos podem estar ocorrendo ao mesmo tempo e contribuindo para a patogênese do HTLV-1.

1.4 MARCADORES DE PROGRESSÃO DAS DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1

A carga proviral do HTLV-1 tem sido apontada como um marcador potencial para avaliar a progressão da doença causada pelo HTLV-1. A carga proviral indica a proporção de células mononucleares do sangue periférico que carrega uma cópia do genoma proviral integrado. Diversos estudos indicam que os pacientes com HAM/TSP têm níveis entre 5 a 6 vezes maior de carga proviral comparados aos indivíduos assintomáticos (BEST *et al.*, 2006; DE SOUZA *et al.*, 2010; KAMIHIRA *et al.*, 2003; MATSUZAKI *et al.*, 2001; NAGAI *et al.*, 2001; OLINDO *et al.*, 2005; SAITO *et al.*, 2009). Além disso, um aumento na carga proviral tem sido observado em indivíduos antes da progressão para a HAM/TSP (TAKENOUCI *et al.*, 2003). Recentemente, nosso grupo avaliou a carga proviral de 281 pacientes acompanhados no Centro de HTLV da EBMSp no período de 2005 a 2008. Os pacientes foram categorizados de acordo com as queixas neurológicas apresentadas segundo os critérios estabelecidos por De Castro-Costa em assintomáticos e em pacientes com HAM/TSP Ps, Pb e D. A carga proviral dos pacientes com HAM/TSP Ps, Pb e D foram estatisticamente superiores à carga proviral dos assintomáticos. Além disso, os valores da carga proviral de pacientes assintomáticos e HAM/TSP-definido foram avaliados em uma curva ROC e foi estabelecido um ponto de corte de 49,865 cópias/10⁶ células (5 % de células infectadas) como o valor que melhor discriminaria pacientes com HAM/TSP-D de indivíduos assintomáticos, com 87% de sensibilidade e 81% de especificidade. Dessa forma, este estudo sugeriu que a carga proviral poderia ser utilizada como um possível biomarcador para progressão da doença (GRASSI *et al.*, 2011). No entanto, não foram avaliados o perfil fenotípico dos linfócitos destes indivíduos.

As principais alterações imunológicas relacionadas ao HTLV-1 são a proliferação linfocitária espontânea, maior expressão de moléculas de ativação (CD25, CD45RO, HLA-DR) em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e ao aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ (CHOI *et al.*, 2002; MUKAE *et al.*, 1994; SUZUKI *et al.*, 1996; YAMANO *et al.*, 2005). Classicamente estas alterações são observadas com maior intensidade em pacientes com diagnóstico de HAM/TSP (BRITO-MELO *et al.*, 2004). Entretanto, uma proporção de indivíduos assintomáticos para HAM/TSP podem apresentar carga proviral igualmente elevada e resposta inflamatória exacerbada

(GRASSI *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2004). Outro possível marcador para a infecção pelo HTLV-1 é expressão da proteína TAX. Diversos estudos associam a expressão de TAX com a gravidade da doença (AKIMOTO *et al.*, 2007; KOENIG *et al.*, 1993; NAGAI, KUBOTA; *et al.*, 2001). Um estudo realizado por YAMANO *et al.* (2002) demonstra que existe um aumento da razão de mRNA de TAX e a carga proviral entre os indivíduos classificados como HAM/TSP e os indivíduos assintomáticos.

Até o momento, não foram identificados marcadores imunológicos associados à progressão da HAM/TSP que possam diferenciar indivíduos assintomáticos daqueles que apresentam manifestações neurológicas iniciais ou incompletas, e que poderiam ser categorizados como HAM/TSP Pb. Nossa hipótese é que as alterações fenotípicas de linfócitos T de pacientes com HAM/TSP provável e definido são semelhantes.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Descrever os marcadores imunológicos em indivíduos infectados pelo HTLV-1 classificados como HAM/TSP Possível (Ps), Provável (Pb) e Definido (D) comparados aos indivíduos assintomáticos.

2.2. ESPECÍFICOS

- Quantificar a carga proviral do HTLV-1.
- Avaliar o fenótipo de ativação dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ (CD25, CD45RA, CD45RO, HLA-DR, CD25, CCR-7, CD62L);
- Detectar a expressão da proteína viral TAX e de FoxP3.

3 PACIENTES E MÉTODOS

A estratégia utilizada foi de acordo a **figura 3**.

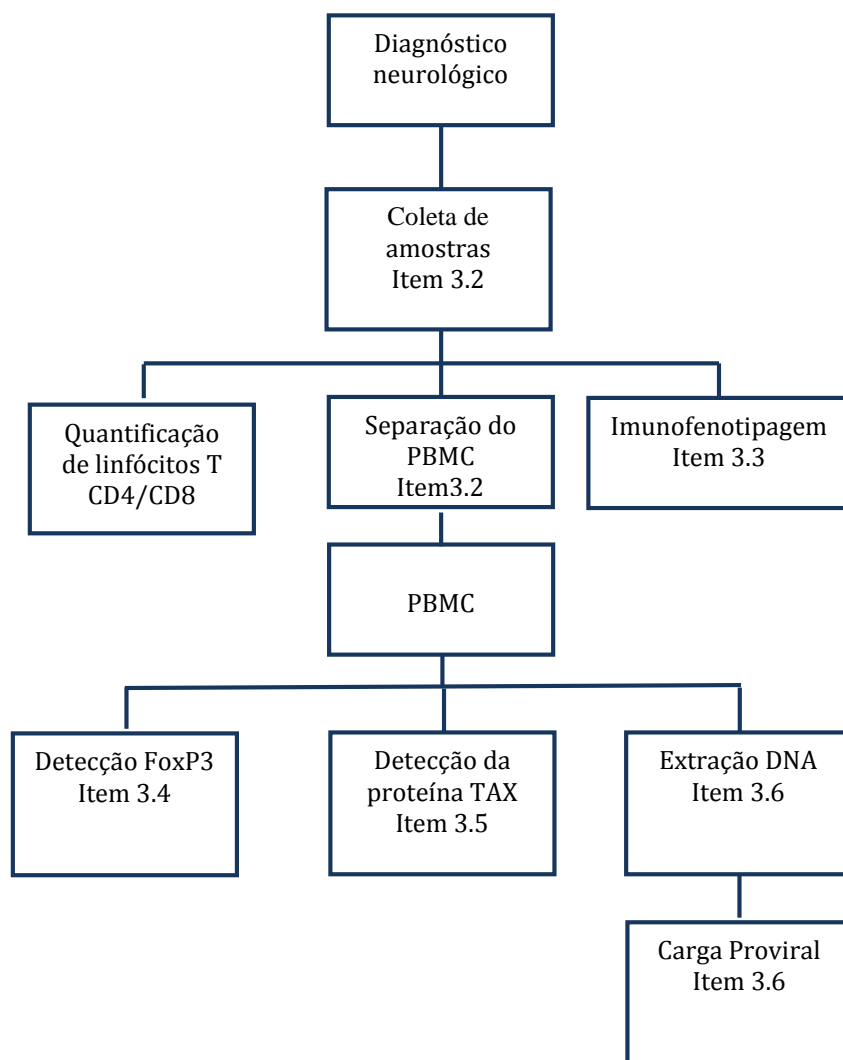


Figura 3. Estratégia metodológica aplicada no estudo.

3.1 ÁREA E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo de corte transversal, que envolve o Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz- FIOCRUZ e o Centro de referência em HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências- FBDC, localizados em Salvador-BA.

Cento e três indivíduos infectados pelo HTLV-1, subdivididos em quatro grupos de pacientes: 1) assintomáticos; 2) HAM/TSP- possível; 3) HAM/TSP- provável; 4) HAM/TSP- definido, foram incluídos neste estudo. Além disso, foram avaliados 19 controles não infectados, doadores voluntários com sorologia negativa para o HTLV-1 selecionados no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA. Foram incluídos indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos ou com diagnóstico de HAM/TSP, segundo classificação clínica De Castro-Costa e colaboradores. Foram excluídos do estudo pacientes com outras infecções virais crônicas (HIV, Hepatites B, C). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos participantes do estudo.

3.2. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)

Foram coletados 25 mL de sangue por punção venosa em tubos contendo heparina (20 mL) e EDTA (5 mL). As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas por gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077g/mL) (GE HealthcareAmersham Biosciences, Sweden). As PBMC obtidas a partir de tubos contendo heparina foram destinadas aos ensaios funcionais ou criopreservadas em solução de soro fetal bovino (SFB) com 10 % dimetilsulfóxido (DMSO). Diversos ensaios de imunofenotipagem foram realizados em sangue total a partir de amostras coletadas em EDTA. As PBMC obtidas em amostras contendo EDTA foram criopreservadas em *pellet* seco a -20°C e -70°C para quantificação da carga proviral do HTLV-1.

3.3 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DO PERFIL DA POPULAÇÃO DOS LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO.

O fenótipo celular dos linfócitos T foi determinado a partir de 50µL de sangue total colhido em tubos contendo EDTA, por marcação membranar com anticorpos monoclonais por 30 min à temperatura ambiente. Após esta incubação, as hemácias foram lisadas com solução de lise (FACS lysing solution Becton-Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). Em seguida as células foram lavadas três vezes em 2,0 mL de solução PBS contendo 0,2 % de soro albumina bovina (BSA). As células marcadas foram fixadas com PBS-Formaldeído 1 % e adquiridas no FACS Aria. Foram adquiridos no mínimo 30 mil eventos. As análises imunofenotípicas foram realizadas usando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, USA) (Tabela 3). As estratégias para identificação das subpopulações de linfócitos estão mostradas nas figuras 4, 5, 6 e 7.

Tabela 3. Imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos analisadas no estudo.

População	Fenótipo
T auxiliar	CD3 ⁺ /CD4 ⁺
T citotóxica	CD3 ⁺ /CD8 ⁺
T ativação	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /HLA-DR ⁺
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /HLA-DR ⁺
	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD25 ⁺
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /CD25 ⁺
T regulatório	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /FoxP3 ⁺
T memória	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD45RO ⁺
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /CD45RO ⁺
T naïve	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD45RA ⁺
T memória efetora	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD45RA ⁻ /CCR7 ⁻ /CD62L ⁻
T memória central	CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /CD45RA ⁻ /CCR7 ⁺ /CD62L ⁺

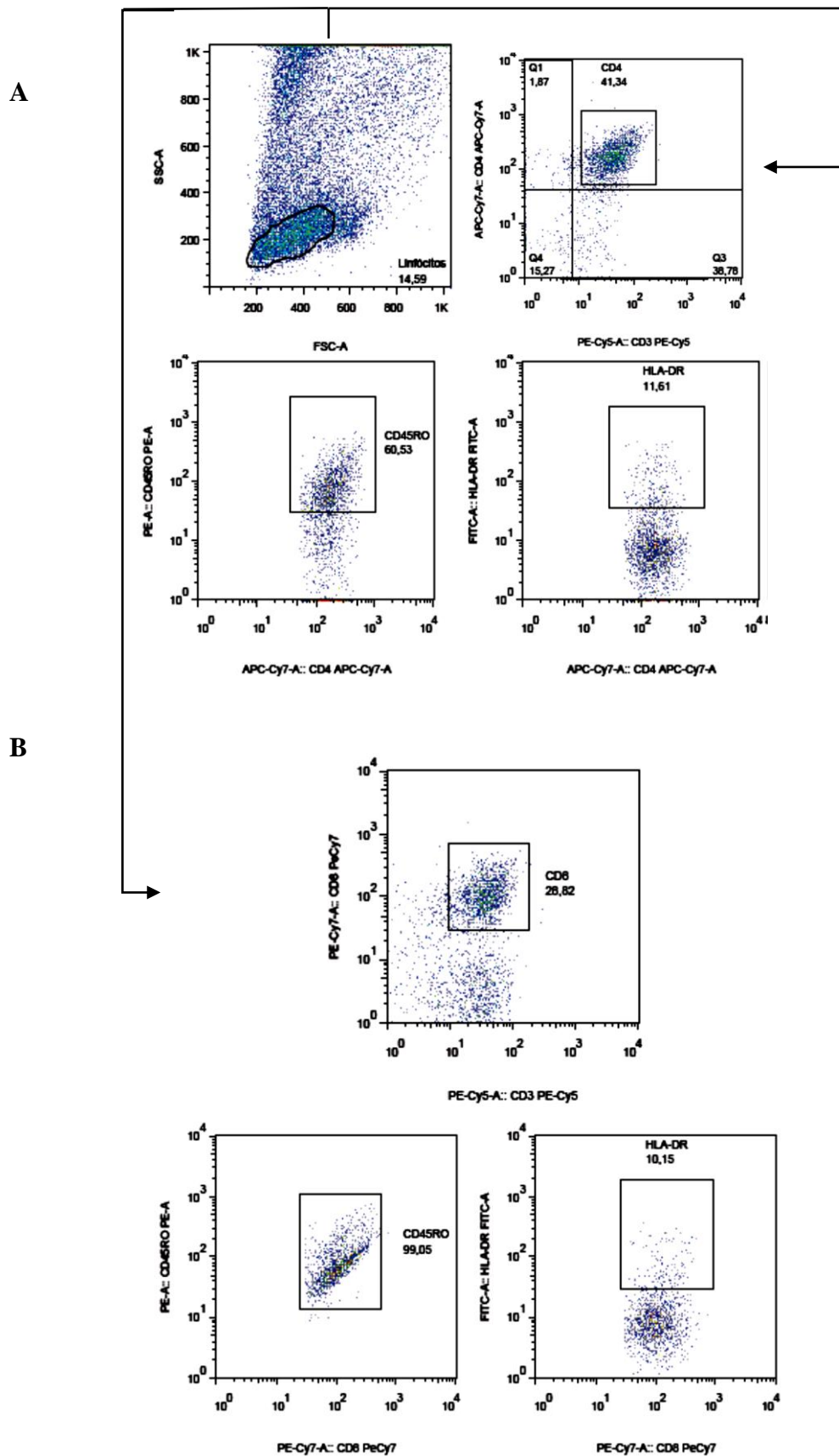


Figura 4. Estratégia para identificação dos marcadores de ativação das subpopulações de linfócitos T. O item A ilustra a estratégia utilizada para identificação de TCD4+ e em B a estratégia para identificação de T CD8+ do sangue periférico.

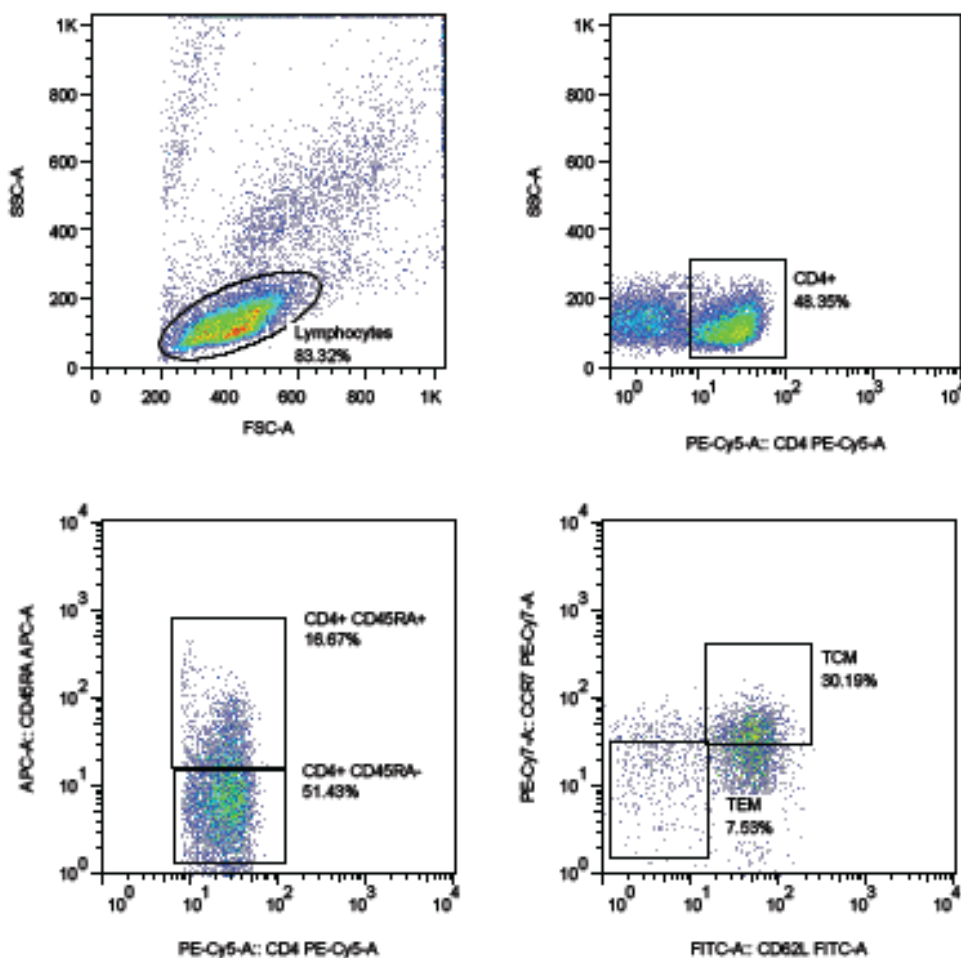


Figura 5. Estratégia para identificação da subpopulação de células T CD4+ naive, memória centra (TCM) e memória efetora (TEM).

3.4 DETECÇÃO INTRACELULAR DE FOXP3.

Para detecção intracelular de FOXP3 foi utilizado o Kit para detecção de FOXP3 (eBioscience, San Diego, USA). Após a marcação extracelular das PBMCs e posterior lise das hemácias, foi adicionado à amostra uma solução permeabilizadora e fixadora (PERM/FIX) por 30 min. a 4 °C. As amostras foram lavadas 2 vezes com a solução permeabilizadora, centrifugadas por 10min a 250xg e bloqueadas utilizando soro de rato por 20 min. Após o bloqueio, foi adicionado anticorpo anti FOXP3 marcado PE por 30 min. a 4 °C e ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas mais uma vez em solução permeabilizadora e finalmente mantidas em solução PBS/formaldeído 1 % a 4 °C até o momento da aquisição. Um mínimo de 30 mil eventos foram adquiridos em

um FACSaria. A estratégia para identificação das células $CD4^+FoxP3^+$ está representada na figura 5. As análises foram realizadas usando o software FlowJO.

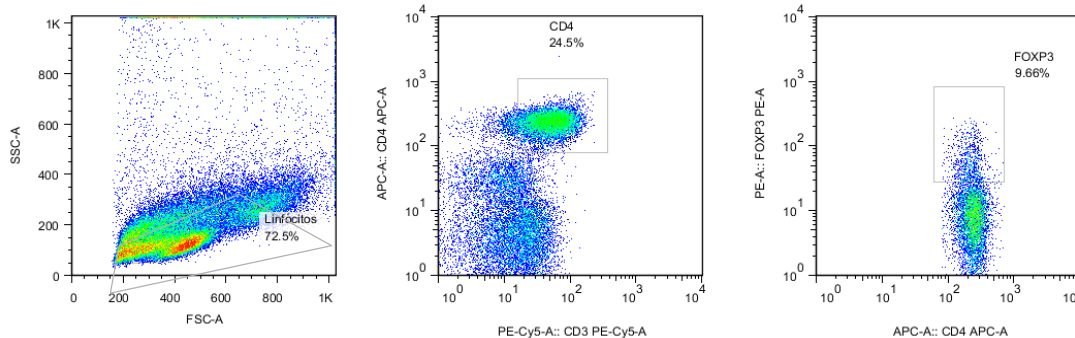


Figura 6. Estratégia para identificação da subpopulação de células T $CD4^+FoxP3^+$.

3.5 DETECÇÃO INTRACELULAR DE TAX.

Para quantificação de células expressando TAX, 1×10^6 PBMCs foram cultivadas por 18 horas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM L-glutamina, 1 % de aminoácidos não-essenciais, 1 mM de piruvato de sódio, 100 U/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina. Posteriormente, as células foram bloqueadas com soro AB por 10 min. e marcadas extracelularmente por anticorpos monoclonais anti-CD4-PE e anti CD3-PE-Cy5 por 30 min. a 4 °C. Após a marcação extracelular, as células foram fixadas utilizando solução PBS-formaldeído 1% por 20 min., lavadas duas vezes com solução PBS/BSA 0,2%, permeabilizadas com PBS/BSA/Saponina 0,2%. As células foram incubadas por 30 minutos com anticorpo monoclonal anti-TAX (FITC) que foi gentilmente cedido através de uma colaboração com o Dr. Yuetsu Tanaka, Departamento de Imunologia, Universidade de Ryukyus, Nakagami, Japão. Ao término da marcação intracelular as células foram mantidas em solução PBS/formaldeído 1% a 4°C até o momento da aquisição. Foram adquiridos pelo menos 40 mil eventos através do FACSaria. A figura 6 mostra a estratégia utilizada para a detecção de TAX. As análises foram realizadas através do software FlowJO.

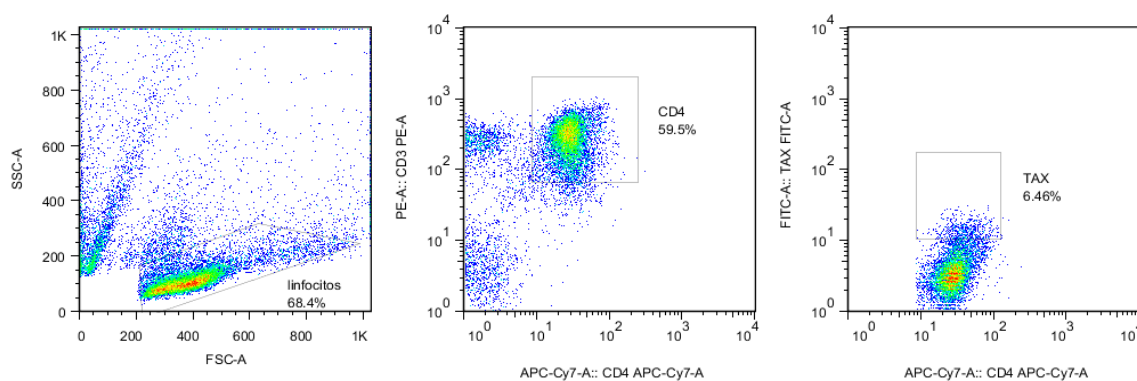


Figura 7. Estratégia para identificação da subpopulação de células T CD4+TAX+.

3.6 EXTRAÇÃO DO DNA E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL

A carga proviral do HTLV-1 foi mensurada por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, através do sistema TaqMan TM da Applied Biosystems Brasil. Para essa análise foi extraído o DNA de 1×10^6 PBMCs. Foram utilizados os *primers* SK110/SK111 para amplificar um fragmento de 186 PB da região pol e a sonda TaqMan (5'FAM and 3' TAMRA) para a sequência de referência do HTLV-1 (HTLVATK), localizada no fragmento 4829-4858 PB. O DNA da albumina foi quantificado em paralelo como controle interno. O DNA das amostras foi extraído utilizando uma coluna de extração (QUIAGEN). A quantificação do DNA de HTLV-1 foi realizada. A quantidade de provírus foi calculada pela fórmula descrita na figura 8.

$$CPV = \frac{n^{\circ} \text{ cópias do HTLV}(\textit{gene pol})}{\frac{n^{\circ} \text{ de cópias albumina}}{2}}$$

Figura 8. Equação para o cálculo da carga proviral do HTLV-1

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados em medianas e valores mínimo e máximo. As análises entre os controles não infectados e os grupos de pacientes classificados como assintomáticos, HAM/TSP-possível, HAM/TSP-provável e HAM/TSP-definido foram realizados utilizando-se o teste Kruskal–Wallis, aplicado o pós-teste de Dunns para comparação entre os grupos. A correlação de Spearman foi realizada para avaliar as associações das amostragens. Foi considerado significativo os valores de $p < 0,05$. Estas análises foram realizadas pelo software Graphpad versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES

A mediana de idade foi semelhante entre os pacientes infectados pelo HTLV-1. Houve um predomínio do sexo feminino em todos os grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Dados demográficos dos indivíduos incluídos no estudo.

Indivíduos	N	Idade (anos)	Sexo
	(94)	Mediana [min-máx]	FEM N (%)
Assintomáticos	44	41 [25-71]*	31 (80)
HAM/TSP-Possível	06	45 [36-68]	3 (60)
HAM/TSP-Provável	07	53 [30-71]	6 (86)
HAM/TSP-Definido	37	48 [32-59]	25 (68)

*Kruskal-Wallis não significante

4.2 AVALIAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

A carga proviral HTLV-1 foi quantificada em 63 dos 94 pacientes (Figura 9). Destes, quarenta e quatro eram assintomáticos, 6 HAM/TSP-Ps, 7 HAM/TSP-Pb e 37 HAM/TSP-definido. A mediana da carga proviral dos pacientes do grupo HAM/TSP-Ps foi 36.967 cópias/10⁶ PBMC, dos HAM/TSP-Provável foi 60.024 cópias/10⁶ PBMC e dos HAM/TSP-definido foi 103.921 cópias/10⁶ PBMC. A carga proviral dos assintomáticos foi 5.133 cópias/10⁶ PBMC. Uma diferença estatisticamente significativa foi observada apenas no grupo HAM/TSP D comparado aos indivíduos assintomáticos (p<0,0001).

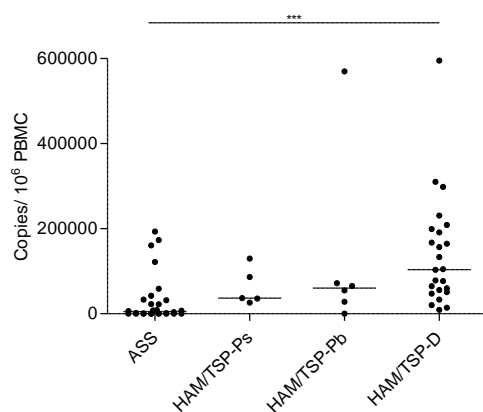


Figura 9. Distribuição da carga proviral entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1: assintomáticos (n=28), HAM/TSP-(Ps) possível (n=5), HAM/TSP-(Pb) provável (n=6) e HAM/TSP-(D) definido (n=24). Os dados representam o número de cópias de HTLV-1 por 10⁶ PBMC. A barra horizontal representa a mediana para cada conjunto de dados.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺

A figura 10 apresenta a análise da proporção dos linfócitos T CD4⁺. A proporção dos linfócitos T CD4⁺ foi semelhante entre os diferentes grupos estudados.

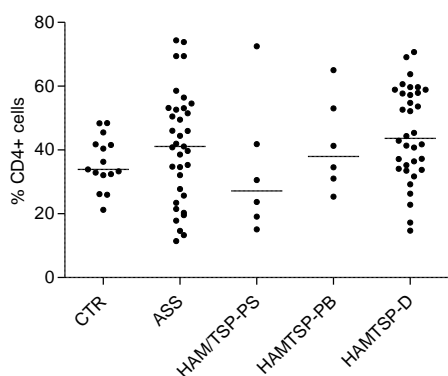


Figura 10. Frequência da população de linfócitos T CD4⁺. Foram avaliados 97 indivíduos: 15 controles não infectados (CTR), 35 assintomáticos, 6 HAM/TSP-possível (Ps), 6 pacientes com HAM/TSP-Provável, 34 pacientes com HAM/TSP definido. Os dados são expressos como proporção da população de linfócitos. A mediana é mostrada com uma barra horizontal para cada conjunto de dados.

A proporção de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ foi maior nos pacientes com HAM/TSP- definido comparados aos controles não infectados ($p=0,01$). Não foram observadas diferenças entre os grupos infectados pelo HTLV-1 (Figura 11-A). A proporção de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ foi maior nos pacientes com diagnóstico de HAM/TSP- possível (mediana 18,06 %), HAM/TSP-provável (mediana 37,67 %) e HAM/TSP- Definido (mediana 16 %) comparados aos controles não infectados (mediana 4,7 %). Observou-se uma diferença entre os indivíduos assintomáticos (mediana 8,85 %) em relação aos pacientes com HAM/TSP-possível e provável ($p<0,0001$) (Figura 11B). Dois pacientes do grupo HAM/TSP-definido apresentaram um proporção de células T CD4⁺HLA-DR⁺ cerca de 15 vezes superior à dos controles não infectados. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre a proporção de células T CD4⁺HLA-DR⁺ e carga proviral (Spearman $R= 0,5$; $p=0,0003$) (Figura 11C).

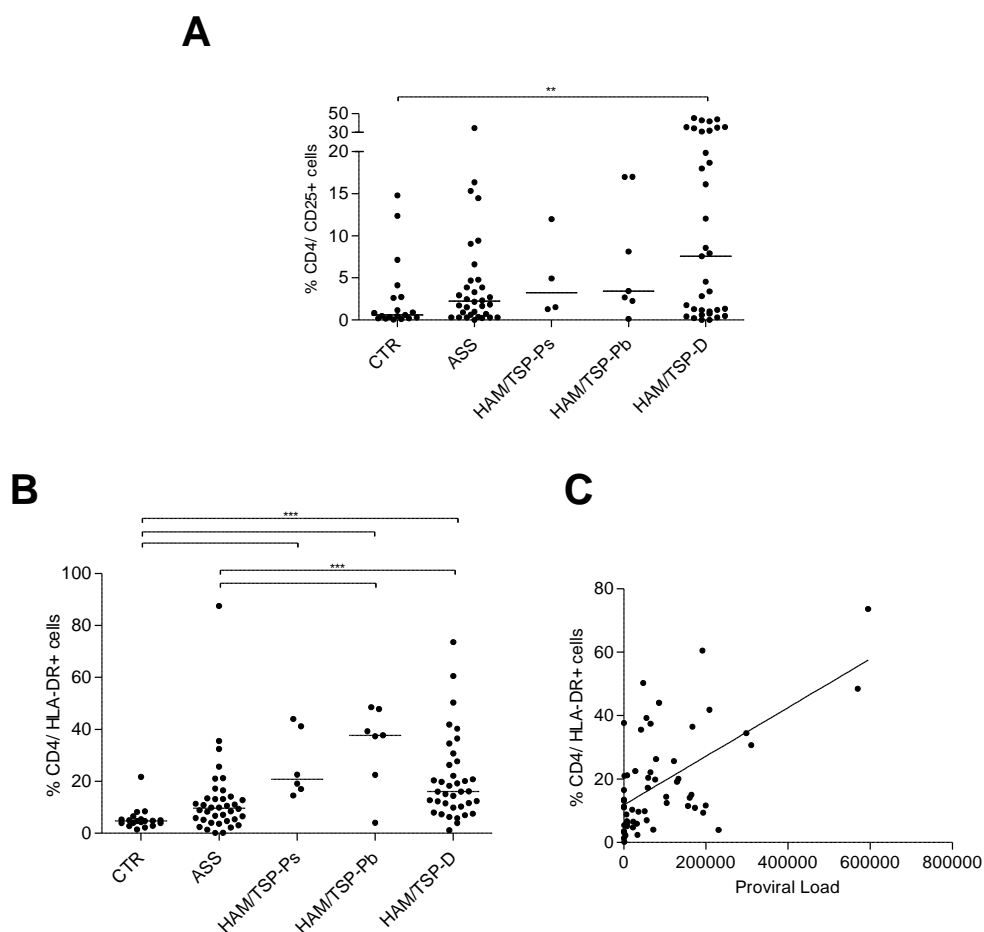


Figura 11. Proporção de linfócitos T CD4⁺/CD25⁺ (A) e T CD4⁺/HLA-DR⁺ (B) em controles não infectados pelo HTLV (19), pacientes com HAM/TSP possível (Ps) $n=6$, Provável (Pb) $n= 7$ e Definido (D) $n=37$. Os dados são expressos como porcentagem de linfócitos. A barra horizontal representa a mediana para cada conjunto de dados. A correlação entre a carga proviral do HTLV-1 (copies/ 10^6 PBMC) e a proporção de células HLA-DR (C) Spearman $r=0,5$, $p=0,0003$.

A figura 12 representa a proporção de linfócitos TCD4+ de memória central e efetora em linfócitos T CD4+. Não houve diferença estatística entre as proporções de células T de memória central entre os grupos de pacientes assintomáticos 33,8 %, HAM/TSP-Ps 30,45 %, HAM/TSP-Pb 21,8 % e HAM/TSP-definido 31,4 %. O grupo controle apresenta o valor da mediana igual a 36 %. Do mesmo modo, as proporções de células efetoras nos grupos estudados foram similares: 8 % para assintomáticos, 8 % para HAM/TSP-Ps, 10 % para HAM/TSP-Pb, 14 % HAM/TSP-D e 4,5 % para o grupo controle. A razão entre a proporção de células de memória central e de células de memória efetora foi similar entre os grupos (Figura 12E).

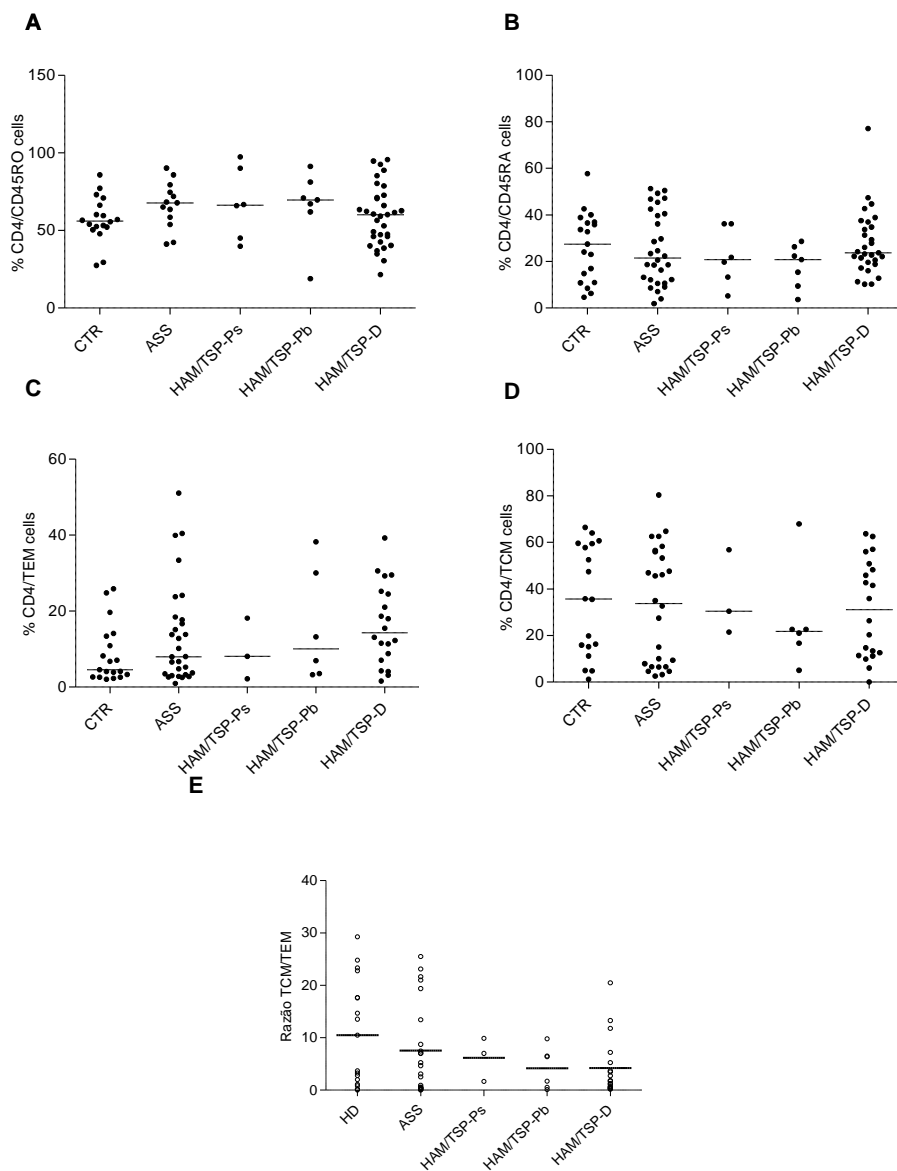


Figura 12. Proporção de linfócitos T memória CD4⁺/CD45RO⁺ (A), linfócitos T *naïve* CD4⁺/CD45RO⁺ (B), memória central CD45RO⁺/CCR7⁺/CD62L⁺ (C), linfócitos T de memória efetora CD45RO⁺/CCR7⁻/CD62L⁻ (D), e representação da razão entre TCM e TEM nos diversos grupos. Ao total foram analisados 97 indivíduos (15 controles, 35 assintomáticos, 7 pacientes HAM/TSP-Ps, 6 HAM/TSP-Pb e 34 pacientes HAM/TSP definido). A mediana é mostrada com uma barra horizontal para cada conjunto de dados.

4.2.1 Proporção dos linfócitos T CD4+FoxP3+

A proporção de células T regulatórias (CD4+/FoxP3+) foi maior nos pacientes com HAM/TSP-definido (4,6 %) e no grupo de assintomáticos (5,75 %) quando comparado aos controles não infectados (1,2 %) ($p=0,04$) (Figura 13A). Observou-se uma correlação positiva entre a proporção de células regulatórias e a carga proviral dos pacientes (Figura 13B) (Spearman $R=0,5$; $p=0,02$).

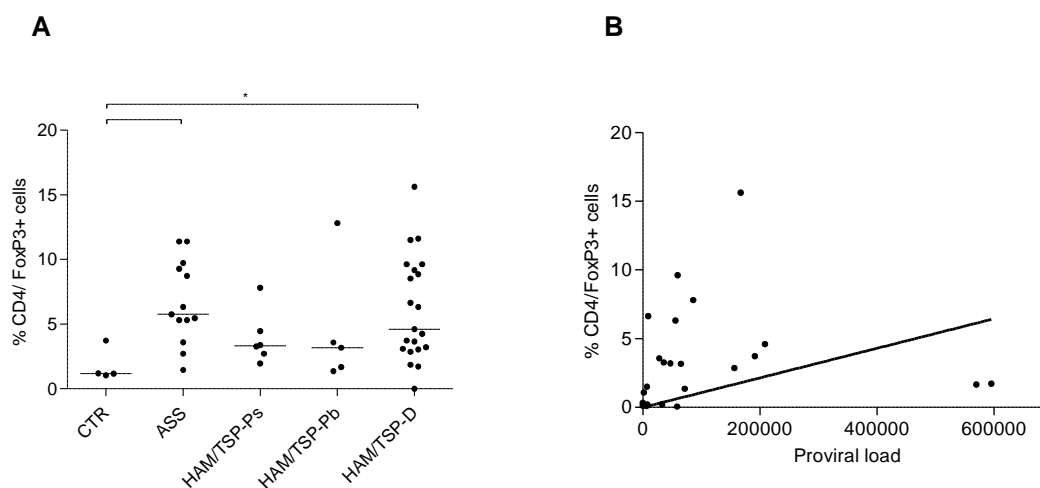


Figura 13. Proporção de linfócitos T CD4+FoxP3+ entre os controles não infectados e os grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomático ($n=13$), HAM/TSP-possível ($n=6$), HAM/TSP-provável ($n=5$) e HAM/TSP-definido ($n=21$). Os dados em A são expressos como porcentagem de linfócitos. A mediana é representada pela barra horizontal para cada conjunto de dados. $*p=0,04$. Em B os valores são representados como a correlação entre a carga proviral do HTLV-1 dos pacientes em relação a expressão de FOXP3 (Spearman $0,5$ $p=0,02$).

4.2.2 Avaliação da expressão da proteína TAX em linfócitos T CD4+

A porcentagem de linfócitos TCD4⁺TAX⁺ foi significativamente maior nos pacientes com HAM/TSP-Ps (5,26 %) e HAM/TSP-D (5,07 %), comparado aos indivíduos assintomáticos (0,26 %) ($p=0,04$) (Figura 14). Não houve correlação entre a CPV e a porcentagem de células expressando TAX.

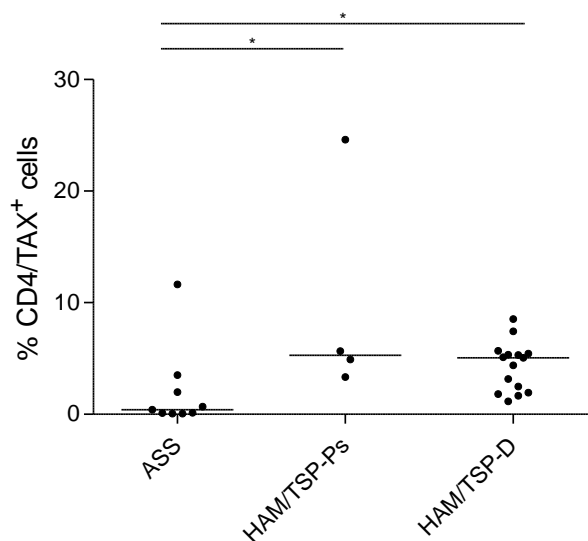


Figura 14. Proporção de linfócitos T CD4⁺TAX⁺ o grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1: assintomáticos (n=10), HAM/TSP-Ps (n=6) e HAM/TSP-definido (n=20). Os dados são expressos como % da população de linfócitos. A mediana é mostrada com uma barra horizontal para cada conjunto de dados.*p=0,01.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8⁺

4.3.1 Avaliação da proporção da ativação de linfócitos T CD8⁺

Foi observada uma proporção semelhante de células T CD8⁺ entre os grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e o grupo controle: 13 % nos assintomáticos, 25 % nos pacientes HAM/TSP-Ps, 17 % nos pacientes HAM/TSP-Pb e de 10 % no grupo HAM/TSP-definido. O grupo controle apresentou uma proporção de 11,6 % (Figura 15A).

Foi observado um aumento nas proporções de linfócitos T CD8⁺CD25⁺, com menores níveis nos assintomáticos e proporções crescentes de acordo com o grau de certeza do diagnóstico de HAM/TSP: assintomáticos (2,5 %), HAM/TSP-Ps (4 %), HAM/TSP-Pb (5,25 %) e de 8,3 % para HAM/TSP-definido. Contudo não houve

diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 15B). A proporção da subpopulação de linfócitos de memória ($CD8^+CD45RO^+$) foi igualmente semelhante entre os grupos avaliados (Figura 15C).

A proporção de linfócitos $CD8^+HLA-DR^+$ foi significativamente superior nos pacientes infectados pelo HTLV-1 comparados aos controles não infectados ($p=0,0001$). As proporções obtidas foram 8,7 % para assintomáticos, 32 % para indivíduos HAM/TSP-Ps, 54 % para indivíduos HAM/TSP-Pb, 24 % para o grupo HAM/TSP-definido e 5,6 % para o grupo controle (Figura 15D). Comparados aos assintomáticos, a proporção de $CD8^+HLA-DR^+$ foi significativamente maior nos grupos HAM/TSP-Pb e HAM/TSP-D ($p<0,0001$). Além disso, observou-se uma correlação positiva entre a proporção de células $CD8^+HLA-DR^+$ e a carga proviral dos pacientes (Spearman $R=0,44$; $p=0,0003$) (Figura 15E).

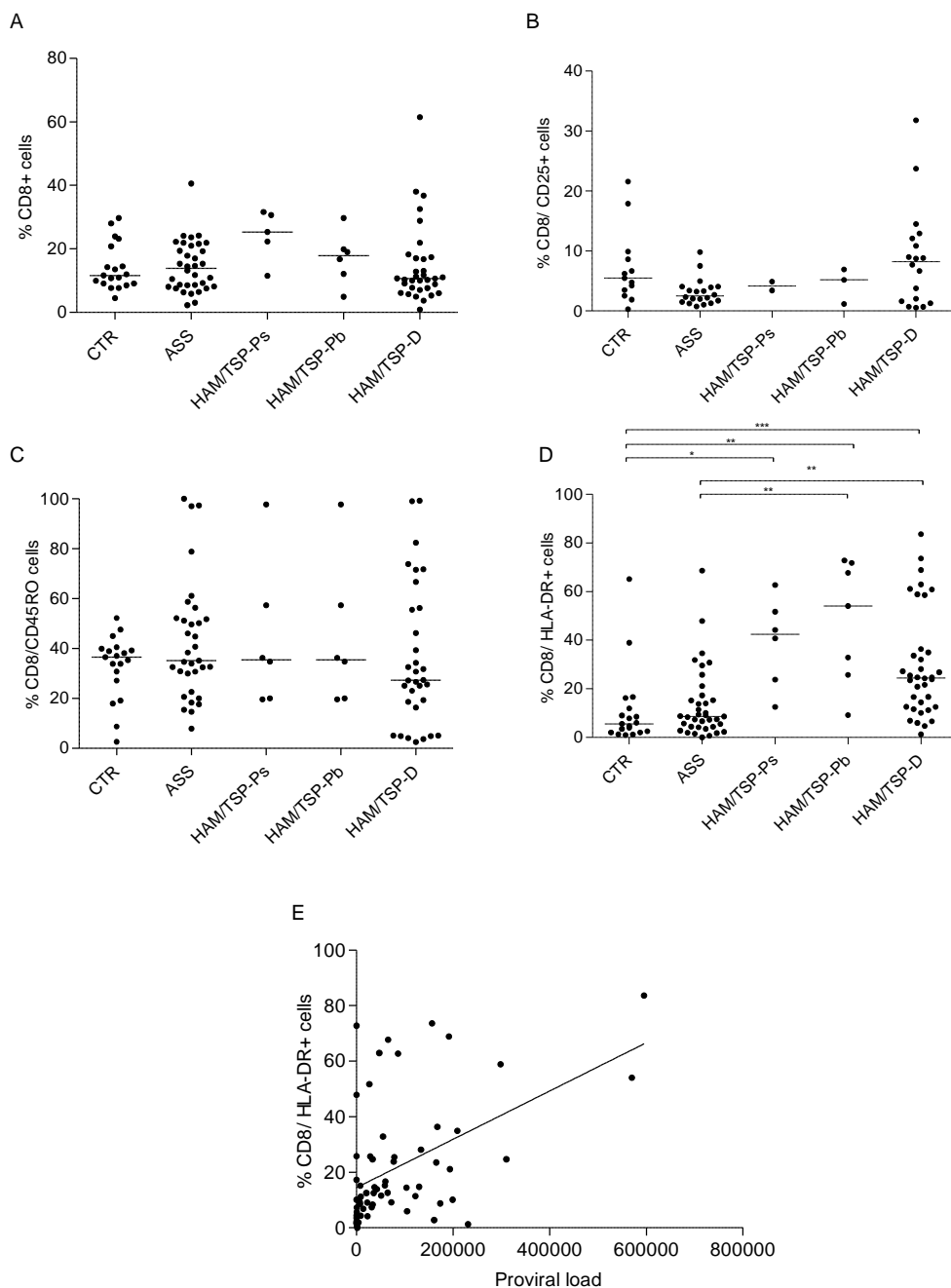


Figura 15. Frequência e a correlação da população de linfócitos T CD8⁺ (A) em indivíduos não infectados e nos grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1. CD8⁺/CD25⁺(B), CD8⁺/CD45RO⁺(C), CD8⁺/HLA-DR⁺(D). Os dados são expressos como porcentagem da população de linfócitos. Ao total foram analisados 97 indivíduos (15 controles, 35 assintomáticos, 7 pacientes HAM/TSP-Ps, 6 HAM/TSP-Pb e 34 pacientes HAM/TSP definido). A mediana é mostrada com uma barra horizontal para cada conjunto de dados. A correlação entre a carga proviral do HTLV-1 (copies/10⁶ PBMC) e a proporção de células CD8⁺/HLA-DR⁺ (E) (*Spearman* $r=0,5$, $p=0,0003$).

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que pacientes infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP apresentam alterações fenotípicas nos linfócitos T que os distinguem dos indivíduos infectados sem sintomas neurológicos. Demonstramos pela primeira vez, que a proporção de linfócitos T CD4+HLA-DR+ e T CD8+HLA-DR+ nos grupos de pacientes com diagnóstico de HAM/TSP Pb e D foi significativamente superior à de indivíduos infectados assintomáticos. Além disso, a proporção de linfócitos T HLA-DR+ foi diretamente correlacionada à carga proviral.

O HLA-DR é uma molécula do MHC de classe II, que é expressa na superfície celular, principalmente das células apresentadoras de antígenos profissionais (células dendríticas, macrófagos e células B). No entanto, os linfócitos podem expressar HLA-DR em resposta a um estímulo, sendo este considerado um marcador de ativação. Na infecção pelo HIV, por exemplo, observa-se uma maior expressão de moléculas de ativação em linfócitos T CD4+ e T CD8+, entre as quais destaca-se o HLA-DR (KELLEHER *et al.*, 1996). Nestes pacientes, a maior expressão de HLA-DR está diretamente associada a um prognóstico ruim e o tratamento antirretroviral de alta eficácia reduz consideravelmente a expressão de HLA-DR (CHOI *et al.*, 2002). Na infecção pelo HTLV-1, a maior expressão desta molécula tem sido igualmente associada ao desenvolvimento de doença. Um aumento na porcentagem de linfócitos T CD4+HLA-DR+ foi descrito em indivíduos oligossintomáticos e em pacientes com HAM/TSP (BRITO-MELO *et al.*, 2002). No entanto, diferente do nosso estudo que evidenciou um aumento da proporção de células T CD4+ e T CD8+ expressando esta molécula, apenas os pacientes com HAM/TSP apresentavam aumento da porcentagem de T CD8+HLA-DR+ (BRITO-MELO *et al.*, 2002).

Um aumento na proporção de células T CD4+ que expressam CD25 foi igualmente observada entre os pacientes com HAM/TSP-D em comparação aos controles não infectados. Porém, os pacientes com HAM/TSP possível e provável apresentaram níveis semelhantes aos assintomáticos. Dados publicados anteriormente indicam um aumento da proporção de células expressando CD25 em indivíduos com HAM/TSP (BUCKLE *et al.*, 1996; KAMIHIRA *et al.*, 1994; MORO *et al.*, 2001).

A molécula CD25 é cadeia α do receptor da IL-2 (IL-2r), que ainda possui outras duas unidades a cadeia β (CD122) e $\gamma\epsilon$ (CD132) (PILLET *et al.*, 2010). Essa molécula é

indispensável para ativação da do linfócito TCD4⁺, pois associação cada cadeia α com o heterodímero β e γ cria um receptor de alta afinidade para a IL-2. De fato, a ligação da IL-2 a esse receptor de alta afinidade associado ao CD28, uma molécula coestimulatória necessária à ativação celular, ativa o ciclo celular, resultando em proliferação e na expansão das células T (APPLEMAN *et al.*, 2000; GAFFEN, 2001; MICHEL *et al.*, 2001; PILLET *et al.*, 2010).

O HTLV-1, através da ação transativadora do gene TAX, induz a produção de IL-2 e de seu receptor, contribuindo para linfoproliferação espontânea observada tanto em indivíduos assintomáticos quanto em indivíduos com HAM/TSP (AZRAN *et al.*, 2004); SATOH *et al.*, 2002; YAMANO *et al.*, 2004). Além disso, as células T CD4⁺CD25⁺ representam reservatórios importantes deste vírus (YAMANO *et al.*, 2009; YAMANO *et al.*, 2004; YAMANO *et al.*, 2005). Embora em nosso estudo, não observamos correlação entre a CPV e a proporção de células CD25⁺, os pacientes com HAM/TSP apresentaram maiores níveis de carga proviral. Assim, o aumento das células expressando CD25 poderia ser decorrente da ativação celular secundária ao estímulo causado pela persistência do vírus.

Ao analisarmos a população de células TCD4⁺ e TCD8⁺ de memória não encontramos diferença nas proporções destas células entre os grupos estudados. Estudos anteriores demonstraram que existe uma proliferação das subpopulações de memória de linfócitos TCD4⁺ ou TCD8⁺ que expressam o CD45RO (JOHANNISSON, 1995; PRINCE *et al.*, 1995). Isso pode ser explicado, em parte, pela utilização de células de linhagem, ou pela manutenção em cultura das células do sangue periférico dos pacientes, aumentando a expressão de marcadores de ativação como o CD25⁺ e a proliferação de células da memória efetora (CD45RO⁺CCR7⁻CD62L⁻).

Ao analisarmos as proporções de células TCD4⁺ *naïves*, de memória central e de memória efetora não encontramos diferenças entre os grupos de indivíduos com HAM/TSP e o grupo de controles não infectados. Contudo, observamos uma tendência a uma menor razão entre a proporção células de memória central e efetoras no grupo de indivíduos com HAM/TSP (Ps, Pb e D) comparado aos controles não infectados. Possivelmente, a menor razão de células de memória central/efetora nos pacientes com HAM/TSP seria reflexo de uma maior carga proviral observada nestes pacientes. Isto resultaria em maior diferenciação de linfócitos de memória central em efetores. Estudos anteriores indicam que existe um redução da expressão de CD45RA (células *naïves*) e um aumento de CD45RO nas células CD25⁺ nos indivíduos com HAM/TSP (OKAYAMA *et al.*, 1997;

RICHARDSON *et al.*, 1990; YAMANO *et al.*, 2005). Nosso grupo, também, mostrou que existe um aumento da expressão de CD45RO em indivíduos com baixa carga proviral (<1%) assintomáticos (Anexo 2). Isso indica que possivelmente os eventos relacionados à ativação celular são precoces na infecção pelo HTLV-1. Além disso, a expansão das células efectoras poderia ser devido a uma maior ativação celular nos pacientes com HAM/TSP resultando em maior produção de citocinas pro inflamatórias Th1 como IL-2 e IFN- γ , o que poderia ativar esta subpopulação celular (BERARD, 2002; MACCHI *et al.*, 1998; SANTANA, 2003).

Em nosso estudo, apenas os pacientes com HAM/TSP-D apresentam uma carga proviral maior quando comparados aos demais grupos do estudo. Recentemente, um estudo de corte transversal, no qual foram analisados 281 pacientes classificados segundo os critérios de diagnóstico de HAM/TSP aplicados neste trabalho: assintomático, HAM/TSP-Ps, Pb e D (GRASSI *et al.*, 2011), foi estabelecido um ponto de corte para a carga proviral de 5% de células infectadas como o melhor valor para diferenciar os indivíduos assintomáticos daqueles que apresentam HAM/TSP-D. Em nosso estudo, não encontramos diferenças na carga proviral nos grupos com HAM/TSP-Ps e Pb. No entanto, o número de pacientes nestes dois grupos foi pequeno e a carga proviral dos pacientes com HAM/TSP-Pb foi superior a 5% de células infectadas. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que sugerem que uma elevada carga proviral resulta em uma intensa ativação celular, a qual progressivamente contribui para o processo de lesão medular, indicando que a carga proviral elevada está associada ao desenvolvimento de HAM/TSP (BEST *et al.*, 2006; OLAVARRIA *et al.*, 2012).

Em relação a células T regulatórias, a proporção das células T CD4⁺FoxP3⁺ foi maior nos indivíduos assintomáticos e nos pacientes com HAM/TSP-D comparado aos controles não infectados. Além disso, observamos uma correlação positiva entre proporção de células com perfil regulatório e a carga proviral. Estes dados sugerem que apesar do aumento de células T regulatórias, estas não exerceriam sua função supressora. De fato, a proteína Foxp3 não está presente apenas em células T regulatórias, podendo ser expressa em linfócitos ativadas (CAVATORTA *et al.*, 2012; SAKAGUCHI *et al.*, 2010). Assim, a proteína Foxp3 poderia ser reflexo da ativação persistente sofrida por estas células. Estudos futuros devem ser conduzidos para avaliar se a função destas células encontra-se comprometida, o que não pode ser avaliado no presente estudo.

Uma vantagem do nosso estudo foi a realização dos ensaios *ex-vivo* a partir das amostras de sangue dos pacientes. Estas análises foram realizadas em um período máximo

de 6 horas após a coleta das amostras de sangue do paciente. Desta forma, acreditamos que nossos resultados sofrem menor influência de processos de ativação celular desencadeados nos ensaios *in vitro* e com maior tempo de cultura. A exceção foi para a detecção da proteína TAX. As células infectadas pelo HTLV-1 expressam a proteína TAX (KOENIG *et al.*, 1993; NAGAI *et al.*, 2001). Contudo, a expressão máxima dessa proteína só ocorre após 18-24h de cultura *in-vitro*. A proteína TAX está envolvida na ativação de genes que aumentam a expressão de fatores associados a proliferação celular como IL-2, IL-2R, IL-4, INF- γ (ASQUITH *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2013; NAGAI *et al.*, 2001; YOSHIDA, 2001). Nossos resultados mostraram um aumento da proporção de células que expressam TAX no grupo HAM/TSP possível e Definido, comparado aos assintomáticos.

Em nosso estudo utilizamos a classificação estabelecida por De Castro Costa (DE CASTRO-COSTA *et al.*, 2006) para diagnosticar HAM/TSP. Desta forma acreditamos caracterizar mais homogeneamente os pacientes incluídos nos estudos. Esta classificação inclui quatro grupos: indivíduos assintomáticos, pacientes HAM/TSP-Possível, HAM/TSP-Provável e HAM/TSP-Definido. Muitos estudos publicados na literatura caracterizam os pacientes infectados pelo HTLV-1 apenas como assintomáticos ou como HAM/TSP, porém uma parte dos pacientes apresentam sintomas neurológicos a exemplo de bexiga neurogênica, não sendo classificados como doentes. Há grande complexidade para diagnosticar a HAM/TSP segundo os critérios da OMS, e isto pode permitir o surgimento de discrepâncias na definição do verdadeiro status clínico do paciente. Esta dificuldade pode contribuir com a variação de resultados entre os estudos. O diagnóstico proposto por de De Castro Costa baseiam-se em três critérios que precisam ser totalmente preenchidos: a) sintomas mielopáticos, b) diagnóstico sorológico do HTLV-1, e c) exclusão de outras doenças que podem causar mielopatia. Uma das vantagens desta proposta é classificar o status clínico dos pacientes segundo o grau de certeza de apresentar mielopatia associada ao vírus, como HAM/TSP-Possível, HAM/TSP-Provável e HAM/TSP-Definido (DE CASTRO-COSTA *et al.*, 2006).

Existe uma grande necessidade de identificação de marcadores para o diagnóstico e evolução para a HAM/TSP. Até o momento, não existem um biomarcador que possa prever a evolução para a doença. A patogênese do HTLV-1 é complexa, pois diferentes fatores possam estar associados a progressão para doença como background genético, carga proviral do HTLV-1, eficiência da resposta imunológica no contexto da infecção, tempo de evolução da infecção, co-infecções, presença de doenças associadas ao HTLV

(dermatológicas, oftalmológicas e psicológicas) (COELHO-DOS-REIS *et al.*, 2007). Recentemente, um estudo retrospectivo em uma coorte japonesa para identificação de possíveis biomarcadores foi mostrado que a concentração de quimiocinas CXCL9 e CXCL10 e neopterinina no líquido são fortes candidatos para avaliar os processos de inflamação da medula vertebral e progressão da doença (SATO *et al.*, 2013). Contudo, o uso de parâmetros estabelecidos em análises do líquido pode trazer dificuldades para a sua execução e eventuais complicações, pois trata-se de uma abordagem invasiva para o uso na rotina de avaliação de progressão de doença dos pacientes.

Em nosso estudo, observamos uma semelhança no fenótipo de ativação de células T CD4+HLA-DR+ T CD8+HLA-DR+ entre os indivíduos com HAM/TSP-Ps, HAM/TSP-Pb e HAM/TSP-D e uma correlação direta com a carga proviral. Os pacientes com HAM/TSP-D pelo critério Castro e Costa preenchem plenamente os critérios estabelecidos pela OMS, com um quadro clínico completo enquanto o grupo HAM/TSP-Pb, corresponde a pacientes com apresentação monossintomática de mielopatia (bexiga neurogênica, sinal de Babinski, espasticidade ou hiperreflexia nos membros inferiores) para os quais outras doenças que se assemelham HAM/TSP foram excluídos. No entanto, pacientes com diagnóstico de HAM/TSP-Pb não são reconhecidos como tendo HAM/TSP pelo critério proposto pela OMS. Nossos resultados indicam que estes dois grupos (Pb e D) apresentam alterações fenotípicas semelhantes em linfócitos T. Em relação ao grupo HAM/TSP-Ps não foi possível identificar alterações no perfil de ativação, exceto na expressão de TAX. É possível que o reduzido número de pacientes incluídos tenha contribuído para esse resultado. Recentemente, evidenciou-se que pacientes com HAM/TSP-Ps e D apresentavam maiores níveis de citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- α e IFN- γ comparados aos indivíduos assintomáticos (STARLING *et al.*, 2013). Em nosso estudo, nós não pudemos determinar o nível de citocinas plasmáticas. No entanto, segundo os critérios de Castro Costa este grupo de pacientes apresentam alterações neurológicas de mielopatia (oligosintomáticos ou quadro clínico completo) que podem ter outras causas como HIV, infecção por hepatite C, deficiência de vitamina B, esclerose múltipla, entre outras. Assim, trata-se de um grupo heterogêneo.

Em resumo, em nosso estudo observamos que a proporção de células que expressam HLA-DR e carga proviral, quando analisados em conjunto, representam marcadores promissores para a discriminação entre os indivíduos assintomáticos daqueles com mielopatia (HAM/TSP-Possível, HAM/TSP-Provável e HAM/TSP-Definido). Os indivíduos com HAM/TSP-Pb devem ter a mesma atenção nos serviços de assistência à

saúde dos pacientes com HAM/TSP-D, tendo em vista, que estes já apresentam, mesmo que de forma isolada, eventos relacionados a mielopatia. Contudo, os critérios de De Castro Costa não substituem completamente os critérios da OMS e representam uma ferramenta complementar ao diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com HAM/TSP. Estudos futuros devem ser realizados para uma avaliação mais acurada desses marcadores.

6 CONCLUSÕES

- A carga proviral é maior nos pacientes HAM/TSP-definido comparado aos assintomáticos;
- Foi observada uma maior expressão de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ HLA-DR⁺ nos pacientes com HAM/TSP definido e provável, comparados aos assintomáticos e maior proporção de células T CD4⁺CD25⁺ nos indivíduos com HAM/TSP definido em comparação aos assintomáticos;
- Foi encontrada uma correlação positiva entre a carga proviral e a proporção de células T CD4⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺HLA-DR⁺;
- A proporção de células T com perfil regulatório foi maior em pacientes infectados pelo HTLV-1, comparado aos controles não infectados. Não existe diferenças entre os grupos assintomáticos e com HAM/TSP definido, No entanto, observa-se uma correlação positiva entre proporção de linfócitos T CD4⁺ a carga proviral;
- A expressão de TAX foi maior nos indivíduos com HAM/TSP-Possível e HAM/TSP Definido em relação aos indivíduos assintomáticos.

REFERÊNCIAS

AKIMOTO, M., et al. Anti-HTLV-1 TAX antibody and TAX-specific cytotoxic T lymphocyte are associated with a reduction in HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers. *J. Med. Virol.*, v. 79, n. 7, p. 977-986, 2007.

ASQUITH, B.; BANGHAM, C. R. How does HTLV-I persist despite a strong cell-mediated immune response? *Trends Immunol*, v. 29, n. 1, p. 4-11, 2008.

ASQUITH, B., et al. In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 19, p. 8035-8040, 2007.

BANGHAM, C. R., et al. Genetic control and dynamics of the cellular immune response to the human T-cell leukaemia virus, HTLV-I. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 354, n. 1384, p. 691-700, 1999.

BANGHAM, C. R.; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene*, v. 24, n. 39, p. 6035-6046, 2005.

BARROS, N., et al. CD4+ T cell subsets and TAX expression in HTLV-1 associated diseases. *Pathog Glob Health*, v. 107, n. 4, p. 202-206, 2013.

BERARD, M.; TOUGH, D. F. Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology*, v. 106, n. 2, p. 127-138, 2002.

BEST, I., et al. Proviral load and immune markers associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Peru. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 146, n. 2, p. 226-233, 2006.

BEST, I., et al. IFN-gamma production in response to TAX 161-233, and frequency of CD4+ Foxp3+ and Lin HLA-DRhigh CD123+ cells, discriminate HAM/TSP patients from asymptomatic HTLV-1-carriers in a Peruvian population. *Immunology*, v. 128, n. 1 Suppl, p. e777-786, 2009.

BRITO-MELO, G. E., et al. Phenotypic study of peripheral blood leucocytes in HTLV-I-infected individuals from Minas Gerais, Brazil. *Scand. J. Immunol.*, v. 55, n. 6, p. 621-628, 2002.

BUCKLE, G. J., et al. HTLV-I-induced T-cell activation. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum. Retrovirol.*, v. 13 Suppl 1, p. S107-113, 1996.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B., et al. Human T cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: should it be a public health concern? *J. Biomed. Sci.*, v. 9, n. 6 Pt 2, p. 587-595, 2002.

CARVALHO, A. S. E. M. Biomarkers in Medicine. *Gazeta Médica da Bahia*, v. Suplemento 1, p. 47-51, 2008.

CASTRO-LIMA VARGENS, C., et al. Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load. *J. Clin. Virol.*, v. 52, n. 3, p. 177-180, 2011.

CATALAN-SOARES, B., et al. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad. Saude Publica*, v. 21, n. 3, p. 926-931, 2005.

CAVATORTA, D. J., et al. Activation-induced FoxP3 expression regulates cytokine production in conventional T cells stimulated with autologous dendritic cells. *Clin Vaccine Immunol.*, v. 19, n. 10, p. 1583-1592, 2012.

CHOI, B. S., et al. The CD28/HLA-DR expressions on CD4+T but not CD8+T cells are significant predictors for progression to AIDS. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 127, n. 1, p. 137-144, 2002.

CLARK. Ex-vivo biomarkers: functional tools to guide target drug development and therapy. *Expert Reviews*, v. 9, n. 8, p. 787-794, 2009.

DE CASTRO-COSTA, C. M., et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, v. 22, n. 10, p. 931-935, 2006.

DE SOUZA, J. G., et al. Anti-TAX antibody levels in asymptomatic carriers, oligosymptomatic carriers, patients with rheumatologic disease or with HAM/TSP do not correlate with HTLV-1 proviral load. *J. Clin. Virol.*, 2010.

DOURADO, I., et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, v. 34, n. 5, p. 527-531, 2003.

DURAMAD, P., et al. Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. *Toxicol. Lett.*, v. 172, n. 1-2, p. 48-59, 2007.

GALVAO-CASTRO, B., et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*, v. 37, n. 2, p. 242-243, 1997.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front. Microbiol.*, v. 3, p. 388, 2012.

GONCALVES, D. U., et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. *Inflamm. Allergy. Drug. Targets.*, v. 7, n. 2, p. 98-107, 2008.

GRASSI, M. F., et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. *J. Med. Virol.*, v. 83, n. 7, p. 1269-1274, 2011.

HASEGAWA, A., et al. Expansion of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) reservoir in orally infected rats: inverse correlation with HTLV-1-specific cellular immune response. *J. Virol.*, v. 77, n. 5, p. 2956-2963, 2003.

IJICHI, S., et al. An autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: a possible pathomechanism of HAM/TSP. *Med. Hypotheses.*, v. 41, n. 6, p. 542-547, 1993.

JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *J. Infect. Dis.*, v. 186 Suppl 2, p. S187-192, 2002.

JOHANNISSON, A.; FESTIN, R. Phenotype transition of CD4⁺ T cells from CD45RA to CD45R0 is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry*, v. 19, n. 4, p. 343-352, 1995.

KALYANARAMAN, V. S., et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, v. 218, n. 4572, p. 571-573, 1982.

KAMIHIRA, S., et al. Significance of soluble interleukin-2 receptor levels for evaluation of the progression of adult T-cell leukemia. *Cancer*, v. 73, n. 11, p. 2753-2758, 1994.

KAMIHIRA, S., et al. Significance of HTLV-1 proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV-1-infected cell count. *Clin. Lab. Haematol.*, v. 25, n. 2, p. 111-117, 2003.

KAPLAN, J. E., et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, v. 3, n. 11, p. 1096-1101, 1990.

KOENIG, S., et al. Characterization of MHC class I restricted cytotoxic T cell responses to tax in HTLV-1 infected patients with neurologic disease. *J. Immunol.*, v. 151, n. 7, p. 3874-3883, 1993.

LA GRENADE, L. HTLV-I-associated infective dermatitis: past, present, and future. *J Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, v. 13 Suppl 1, p. S46-49, 1996.

LEPOUTRE, V., et al. Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, v. 14, p. 1152-1168, 2009.

LEVIN, M. C.; JACOBSON, S. Cellular and humoral immune responses associated with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Ann N Y Acad Sci*, v. 835, p. 142-152, 1997a.

_____. HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): a chronic progressive neurologic disease associated with immunologically mediated damage to the central nervous system. *J. Neurovirol.*, v. 3, n. 2, p. 126-140, 1997b.

MACCHI, B., et al. Human Th1 and Th2 T-cell clones are equally susceptible to infection and immortalization by human T-lymphotropic virus type I. *J. Gen. Virol.*, v. 79 (Pt 10), p. 2469-2474, 1998.

MACLEOD, M. K., et al. CD4 memory T cells divide poorly in response to antigen because of their cytokine profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 105, n. 38, p. 14521-14526, 2008.

MANNS, A., et al. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int. J. Cancer.*, v. 51, n. 6, p. 886-891, 1992.

MATSUZAKI, T., et al. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J. Neurovirol.*, v. 7, n. 3, p. 228-234, 2001.

MEEKINGS, K. N., et al. HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP. *PLoS Pathog.*, v. 4, n. 3, p. e1000027, 2008.

MOCHIZUKI, M., et al. HTLV-I uveitis. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, v. 13 Suppl 1, p. S50-56, 1996.

MORGAN, O. S., et al. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet*, v. 2, n. 8673, p. 1184-1187, 1989.

MORO, H., et al. Interleukin-2-dependent but not independent T-cell lines infected with human T-cell leukemia virus type 1 selectively express CD45RO, a marker for persistent infection in vivo. *Virus Genes*, v. 23, n. 3, p. 263-271, 2001.

MUKAE, H., et al. Increase in T-cells bearing CD25 in bronchoalveolar lavage fluid from HAM/TSP patients and HTLV-I carriers. *Microbiol. Immunol.*, v. 38, n. 1, p. 55-62, 1994.

MURARO, P. A., et al. Human autoreactive CD4+ T cells from naive CD45RA+ and memory CD45RO+ subsets differ with respect to epitope specificity and functional antigen avidity. *J. Immunol.*, v. 164, n. 10, p. 5474-5481, 2000.

NAGAI, M.; JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Curr. Opin. Neurol.*, v. 14, n. 3, p. 381-386, 2001.

NAGAI, M., et al. Increased activated human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax11-19-specific memory and effector CD8+ cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV-I provirus load. *J. Infect. Dis.*, v. 183, n. 2, p. 197-205, 2001.

NAGAI, M., et al. Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I Tax-specific CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. *Ann. Neurol.*, v. 50, n. 6, p. 807-812, 2001.

NISHIOKA, K. HTLV-I arthropathy and Sjogren syndrome. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, v. 13 Suppl 1, p. S57-62, 1996.

OLAVARRIA, V. N., et al. Evolution of HTLV-1 proviral load in patients from Salvador, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 16, n. 4, p. 357-360, 2012.

OLINDO, S., et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. *J. Neurol. Sci.*, v. 237, n. 1-2, p. 53-59, 2005.

OSAME, M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J. Neurovirol.*, v. 8, n. 5, p. 359-364, 2002.

OSAME, M., et al. HTLV-1 associated myelopathy (HAM). *Kansenshogaku Zasshi*, v. 62 Suppl, p. 240-8, 1988.

POIESZ, B. J., et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

PRINCE, H. E., et al. Spontaneous proliferation of memory (CD45RO+) and naive (CD45RO-) subsets of CD4 cells and CD8 cells in human T lymphotropic virus (HTLV) infection: distinctive patterns for HTLV-I versus HTLV-II. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 102, n. 2, p. 256-261, 1995.

PROIETTI, F. A., et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*, v. 24, n. 39, p. 6058-6068, 2005.

SAITO, M., et al. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology*, v. 6, p. 19, 2009.

SAKAGUCHI, S., et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev. Immunol.*, v. 10, n. 7, p. 490-500, 2010.

SANTANA, M. A.; ROSENSTEIN, Y. What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J. Cell. Physiol.*, v. 195, n. 3, p. 392-401, 2003.

SATOH, M., et al. Involvement of IL-2/IL-2R system activation by parasite antigen in polyclonal expansion of CD4(+)25(+) HTLV-1-infected T-cells in human carriers of both HTLV-1 and *S. stercoralis*. *Oncogene*, v. 21, n. 16, p. 2466-2475, 2002.

SONODA, S. [Immune response to HTLV-I infection]. *Uirusu*, v. 42, n. 1, p. 29-39, 1992.

SUZUKI, M., et al. Clinical significance of CD45RO expression on peripheral blood mononuclear cells in HTLV-I-infected individuals. *Br. J. Haematol.*, v. 92, n. 2, p. 401-409, 1996.

TOULZA, F., et al. High frequency of CD4⁺FoxP3⁺ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood*, v. 111, n. 10, p. 5047-5053, 2008.

TOULZA, F., et al. Human T-lymphotropic virus type 1-induced CC chemokine ligand 22 maintains a high frequency of functional FoxP3(+) regulatory T cells. *J. Immunol.*, v. 185, n. 1, p. 183-189, 2010.

URETA-VIDAL, A., et al. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. *Int. J. Cancer.*, v. 82, n. 6, p. 832-836, 1999.

WOLFE, N. D., et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 102, n. 22, p. 7994-7999, 2005.

YAMANO, Y., et al. Abnormally high levels of virus-infected IFN-gamma⁺ CCR4⁺ CD4⁺ CD25⁺ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS One*, v. 4, n. 8, p. e6517, 2009.

YAMANO, Y., et al. Increased expression of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) Tax11-19 peptide-human histocompatibility leukocyte antigen A*201 complexes on CD4⁺ CD25⁺ T Cells detected by peptide-specific, major histocompatibility complex-restricted antibodies in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *J. Exp. Med.*, v. 199, n. 10, p. 1367-1377, 2004.

YAMANO, Y., et al. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood*, v. 99, n. 1, p. 88-94, 2002.

YAMANO, Y., et al. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J. Clin. Invest.*, v. 115, n. 5, p. 1361-1368, 2005.

YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 19, p. 475-496, 2001.

ANEXOS

Anexo 1-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Investigação:

Biomarcadores imunológicos no monitoramento da infecção pelo HTLV-1

Pesquisadores Responsáveis: Dra Fernanda Grassi; Dr Bernardo Galvão

Médico Responsável: Dr. Ramon Kruchewsky

Prez
ado
paci
ente:

O Sr(a) está sendo convidado para participar desta pesquisa que pretende verificar se pacientes infectados pelo HTLV apresentam alguma diferença na atividade das células do sangue. A infecção pelo vírus chamado HTLV-1 pode causar dois tipo de doença: uma leucemia (câncer de glóbulos brancos do sangue) ou uma doença do sistema nervoso, que causa paralisia, porém muitas pessoas não apresentam nenhuma doença. Este estudo pretende buscar diferenças nos exames das pessoas que são infectadas por esse vírus e tem manifestações diferentes (tem doença ou não tem nenhum sintoma). Nesse sentido, acreditamos que esse estudo poderá ser contribuir para que no futuro os pacientes possam ser tratados antes de manifestarem a doença.

Para que isso seja possível realizar esta pesquisa pedimos a doação de uma amostra de sangue que permitirá estudar suas células sanguíneas. Essas amostras serão obtidas no momento em que exames de sangue forem necessários para o seu próprio acompanhamento clínico. Aproveitaremos o pedido de coleta de sangue para o exame de rotina, e solicitaremos ao laboratório que retire um pouco a mais (cerca de 5 colheres de sopa) para esta pesquisa. Assim sendo, o número de vezes que o sangue será retirado não será maior do que o realmente necessário para o acompanhamento de rotina e não será necessário vir ao Centro médico apenas como objetivo de participar da pesquisa.

A coleta de sangue será realizada por um profissional treinado, entretanto pode ocorrer uma dor ligeira e um pequeno sangramento no local da picada, ficando o braço roxo. Esta mancha desaparece dentro de 1 a 2 dias.

A sua participação neste estudo é voluntária e espontânea. A sua assistência médica não será modificada em função da sua aceitação ou não em participar deste estudo. Também não envolverá nenhum custo adicional. Caso necessite regressar ao hospital por razões ligadas ao estudo, suas despesas com transporte e alimentação serão pagas pelos responsáveis pela pesquisa.

Além disso, você poderá desistir de participar a qualquer momento sem que isto interfira no tratamento futuro neste hospital. O material obtido de sua amostra de sangue (plasma e células) será utilizado apenas neste estudo. Toda a informação obtida ou disponibilizada neste estudo será considerada como sigilosa de modo a garantir confidencialidade e não será divulgada sem a sua permissão.

Para que outros médicos possam no futuro ampliar seus conhecimentos sobre esta doença, gostaríamos de mostrar os resultados obtidos neste projeto em congressos (pôster ou apresentação oral) e em publicações em revistas científicas.

Por outro lado, nos comprometemos a não dizer seu nome e utilizar os resultados obtidos apenas com finalidade científica.

A equipe de pesquisadores (Dr. Bernardo Galvão, Dra. Fernanda Grassi e Dr. Ramon Kruchewsky)

está disponível a qualquer momento para qualquer esclarecimento no número 3176-2213.

Caso queira, o Sr(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas da Fiocruz pelo telefone 3176-2285.

Eu _____

Aceito fazer parte do grupo de estudo “**Biomarcadores imunológicos no**

monitoramento da infecção pelo HTLV-1”

Recebitodas as orientações sobre este trabalho. Entendi o propósito do estudo, e compreendo que o objetivo deste estudo é uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção causada pelo vírus HTLV-1. Sei que este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana.

Estou recebendo uma cópia deste documento datada e assinada, e não estou abdicando de nenhum dos meus direitos legais.

SALVADOR, _____/_____/_____.

Assinatura: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Anexo 2- Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load is associated with activation of T-lymphocytes in HTLV-1-infected asymptomatic individuals

Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load induces activation of T-lymphocytes in asymptomatic carriers

Raimundo COUTINHO JUNIOR¹, Maria Fernanda Rios GRASSI^{1,2}; Ana Beatriz KORNGOLD¹; Viviana Nilla Olavarria, Bernardo GALVÃO-CASTRO^{1,2} & Rita Elizabeth MASCARENHAS^{1,2}

1-Advanced Laboratory of Public Health/CPQGM – Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador- Bahia- Brazil

2- Bahiana School of Medicine and Public Health, Salvador – Bahia – Brazil

Corresponding author:

Dr. Maria Fernanda Rios Grassi,

LASP/CPqGM/Fiocruz

Rua Waldemar Falcão, no 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40296-710, Brazil

Tel.: +55 71-3356 8822 Fax.: +55 71-3356 4320 extension 300

grassi@bahia.fiocruz.br

Abstract

Introduction. High HTLV-1 proviral load (PVL) is mainly found in infected individuals with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). However one third of asymptomatic carriers may have high PVL.

Objective. To evaluate the impact of PVL in the activation of T lymphocytes of asymptomatic individuals infected with HTLV-1.

Methods. Membrane activation markers (CD25⁺, CD28⁺, CD45RO⁺, CD69⁺, CD62L⁺, HLA-DR⁺), FoxP3⁺ and intracellular IFN- γ expression were evaluated on both CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes from asymptomatic carriers with PVL \geq and $<$ 1% of infected cells, using flow cytometry. HTLV-1 proviral load was determined using real-time PCR.

Results: Asymptomatic carriers with PVL \geq 1% presented a higher frequency of CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ (13.2% vs. 4%, p=0.02), CD4⁺HLA-DR⁺ (18% vs. 8.3%, p=0.01) and CD4⁺IFN- γ ⁺ (4.5%; 1%, p=0.01) T-cells, than healthy donors. HTLV-1 PVL was directly correlated with the proportion of CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ T-cells (R=0.7, p=0.003). Moreover, a significant increase in the proportion of CD4⁺FoxP3⁺ T-cells was observed in HTLV-1-infected individuals, compared to healthy donors.

Conclusion: HTLV-1 PVL is associated with activation of both CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in asymptomatic individuals. Prospective studies should be conducted to evaluate whether asymptomatic individuals with higher PVL and high immune activation are more prone to developing HTLV-1-associated diseases

Key words: HTLV-1, Foxp3, proviral load, asymptomatic

Introduction

The human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) was the first retrovirus known to cause disease in humans, initially isolated from the lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma in 1980 [1]. An estimated 10 to 20 million individuals are currently infected with HTLV-1 worldwide, mostly clustered in Japan, the Caribbean, Africa, and Latin America, with Brazil having the highest number of infected individuals [2]. This virus is recognized as the etiologic agent of HTLV-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) [3, 4] and adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) [5], which affect less than 5% of all infected individuals, and occasionally causes HTLV-associated uveitis (HAU) [6] and infective dermatitis in children [7]. Other infectious diseases, such as strongyloidiasis [8] and tuberculosis [9, 10], have also been described at a higher prevalence in patients infected with HTLV-1.

The association with these infectious diseases suggests that HTLV-1 may impair the host immune response, possibly leading to immunosuppression. Similar to the human immunodeficiency virus (HIV), HTLV-1 also integrates its genome into host cells, thereby establishing a persistent chronic infection. While HIV induces a potent immunodepression by destroying CD4⁺ T-cells, HTLV-1 promotes the spontaneous proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets, as well as NK cells [11-13].

HTLV-1-infected individuals frequently present immunological abnormalities, such as increased inflammatory cytokine production and T-lymphocyte activation, as well as a reduced lymphoproliferative response to recall antigens *in vitro* [13, 14]. Moreover, immune system activation occurs more frequently and with greater intensity in individuals with HAM/TSP [14, 15]. These individuals often present alterations in regulatory T-cells [16, 17].

In the HIV infection, the plasmatic viral load is positively correlated with the intensity of T-cell activation, as well as the destruction of CD4⁺ T-lymphocytes and a progression to AIDS [18]. By contrast, HTLV-1 proviral load (PVL) is not widely recognized as a biomarker to predict HTLV-associated disease evolution. HTLV-1 PVL is considered low if the proportion of infected PBMCs is lower than 1%, and high if greater than 5% [19]. High PVLs are commonly found in individuals with HAM/TSP [20, 21], infective dermatitis [22] and Keratoconjunctivitis sicca [23]. However, in some cases, asymptomatic individuals may have high PVLs and exhibit an exacerbated inflammatory response [14, 21]. To investigate the association between PVL and immune

system activation, the present study evaluated the phenotypic profile of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in asymptomatic individuals infected with HTLV-1.

Methods

Subjects. Asymptomatic HTLV-1-infected subjects were sequentially selected from the Bahia School of Medicine and Public Health HTLV reference center (Salvador, Bahia, Brazil). They were included if evaluated neurologic examination was normal and had no clinical complaints. Eleven laboratory staff volunteered as non-infected controls. All samples were screened for HTLV-1/2 antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Ab-Capture ELISA Test System – Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey), and positive results were confirmed by Western Blot (HTLV Blot 2.4, Genelabs Technologies, Singapore). Informed written consent was obtained from all enrolled individuals and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) Institutional Review Board approved this study.

Proliferation assay. Blood samples were collected from all study subjects in heparin tubes and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using a Ficoll-Hypaque density gradient centrifuge (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Cultures of 10^5 PBMCs were incubated in triplicate for five days (37°C , 5% CO_2) in RPMI-1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin and pooled human AB serum (10%) (Sigma). On the last day of incubation, cells were pulsed overnight with 1 μCi [^3H]thymidine (specific activity, 2 Ci/mmol; ICN, Costa Mesa, CA). Incorporated [^3H]thymidine was measured in terms of mean counts per minute (CPM) using β -radiation counter (MATRIX 9600 direct beta counter; Packard). Spontaneous proliferation of PBMCs was considered when a mean CPM value ≥ 500 due in triplicates (i.e., three times the mean counts per minute measured in uninfected control cells) was obtained.

Flow cytometry. 50 μl of whole blood was incubated for 15 min at room temperature with anti-CD4 (BD Pharmingen Technical) and the following monoclonal antibodies: CD45RO, CD25, CD69, CD62L, CD28, and HLA-DR (Immunothec, a Beckman Coulter Company). Erythrocytes were subsequently lysed with FACSTM lysing solution (Becton-Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). After a final wash, the cells were fixed in PBS containing 1% paraformaldehyde. Alternatively, for detection of intracellular FoxP3, 80 μl of whole blood was incubated for 15 min at room temperature with anti-CD3 and CD4 monoclonal antibodies (Becton Dickinson, Mountain View, Calif.), after 15 min the cells were washed twice with PBS-BSA-Saponin 0,2% and

blocked with AB serum 1% for 5 min. After that, the cells were incubated with anti-FoxP3 for 30 min. The cells were washed and fixed. Analyses were performed using FACSaria II (Becton Dickinson, Mountain View, Calif.) and the software FlowJo 7.5 (Tree stars, San Diego). At least 10^5 events were analyzed per sample.

Detection of intracellular IFN- γ . PBMCs (2×10^5 cells/well) were cultured in RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) medium, supplemented with 25mM of HEPES, 2mM of L-glutamine, 1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/mL of penicillin, 100 g/mL of streptomycin and 10% pooled human AB serum (Sigma), and plated in triplicate in 96-well U-bottom plates (Costar, Cambridge, MA), then incubated for 4h at 37°C under 5% CO₂. Next, monensin and brefeldin (3 μ g/ml) in AB serum (10%) (Sigma) were added to each culture, and then reincubated for 16h. The cells were then washed with PBS-BSA-PFA-azide (2 mL) and stained with monoclonal anti-CD4, and antiCD3 antibodies for 15min at 4°C. The cells were then fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde 200 μ l for 20 min at room temperature, followed by two washing cycles with 0.1% PBS-BSA-Saponin. Positive control cells were cultured with 2 μ g/ml phytohaemagglutinin (PHA) (Sigma). To conduct intracellular cytokine staining, the cells were then reincubated for 30 min with anti-IFN- γ -PE monoclonal antibodies or isotype controls, then washed with 0.1% PBS-BSA-Saponin, and washed again with PBS-BSA-PFA-azide. Cells were analyzed using a FACSort flow cytometer and data was interpreted by Cellquest software (Becton Dickinson, Mountain View, Calif.).

Proviral load. PBMCs were obtained from EDTA blood using density gradient centrifugation and cryopreserved until use. DNA was extracted using a DNA extraction system (Qiagen, Hilden, Germany). HTLV-1 proviral load was quantified using a real-time TaqMan polymerase chain reaction (PCR) method, as previously described [24]. Briefly, SK110/SK111 primers were used to amplify a 186 bp fragment of the *pol* gene and dual TaqMan probe (50-FAM/50 VIC and 30-TAMRA) was attached at 4,829–4,858 bp of the HTLV-1 reference sequence (HTLVATK). Albumin DNA was used as an endogenous reference and HTLV-1 proviral load was calculated as the ratio of [(HTLV-1 DNA average copy number)/(albumin DNA average copy number)] $\times 2 \times 10^6$ and expressed as the number of HTLV-1 copies per 10^6 PBMCs.

Statistical analyses. Data are expressed as median and interquartile range (25th percentile and the 75th percentile). Kruskal–Wallis non-parametric analysis of variance

with the Bonferroni-Dunn multiple comparison tests was used to compare healthy donors, asymptomatic with PVL \geq and $<$ 1% of infected cells groups. The Fisher exact chi-square test was used to compare lymphoproliferation frequencies. The correlations were performed by Spearman correlation test. Significant differences were considered for $p < 0.05$. GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA) Software was used for all statistical analyses.

Results

The median PVL in all HTLV-1-infected carriers was 1.7% of infected cells (IQR, interquartile range 0.15-23%), 48% of them had PVL higher than 1% of infected cells. There were no statistically significant differences in markers of cellular activation of CD4⁺ T-lymphocytes between PVL \geq 1% and <1% HTLV-1-infected groups (Figure 1A). The proportion of both CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ and CD4⁺HLA-DR⁺ T-cells from infected individuals with PVL \geq 1% was higher than healthy donors (13.2% vs 4.0%, $p=0.02$; 18.0% vs. 8.3%, $p=0.02$, respectively).

Moreover, the frequency of CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ T-cell subset was directly correlated to the HTLV-1 PVL ($R = 0.7$, $p = 0.003$).

Concerning the CD8⁺ T-cell subset (Figure 1B), the frequency of CD8⁺CD28⁺ cells was similar between PVL \geq 1% e <1% groups. A lower frequency of cells expressing CD28 was observed in HTLV-1-infected individuals with CPV <1% (median 64%, IQR 51-75%) compared to healthy donors (median 91%, IQR 71-98%) ($p=0.01$).

A higher frequency of CD4⁺IFN- γ ⁺ T-cells (4.5%) was observed in the PVL \geq 1% group, compared to healthy donors (1%) ($P = 0.01$), while frequencies of CD8⁺IFN- γ ⁺ T-cells was similar for HTLV-1 infected groups and healthy donors (Figure 2). The frequencies of individuals with spontaneous lymphocyte proliferation in the group CPV \geq 1% (72%, 13 out of 18) was similar to that observed in the group CPV <1% (64%, 7 out of 11) ($P = 0.69$). There was no difference between the magnitudes of proliferation between both groups. However, considering only patients that presented spontaneous proliferation, a positive correlation between PVL and magnitude proliferation was observed ($R = 0.7$; $P = 0.007$). The frequency of CD4⁺FoxP3⁺ T-cells was higher among individuals infected with HTLV-1, compared to healthy donors ($P=0.01$) (Figure 3).

Discussion

HTLV-1 PVL represents the amount of virus integrated into DNA genome. A higher frequency of activated CD4⁺ T-lymphocytes expressing CD25⁺CD45RO⁺, HLA-DR⁺ and of cells producing IFN- γ were mostly observed in the subgroup of infected individuals with CPV \geq 1% of infected cells, compared to healthy donors. Activation of T-lymphocytes has been reported more often in HAM/TSP patients. In those, an expansion in the number of T CD4⁺ e T CD8⁺ lymphocyte subpopulations that present an higher expression of activation molecules such as CD25 and HLA-DR, a decrease in the expression of CD28 costimulatory molecule, and of CD18 molecule involved in the adhesion and cell migration into inflammatory are observed, compared to asymptomatic carriers [15, 25, 26]. An exacerbated production of proinflammatory cytokines, such as IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-6, and IL-15 have also been reported more frequently in patients with HAM/TSP [14, 27-29]. However, in some asymptomatic HTLV-1-infected individuals the activation of the immune system is similar to those with HAM/TSP [14, 28]. The influence of HTLV-1 PVL on the immune system was not addressed in these studies.

HTLV-1 PVL represents the number or percentage of host cells harboring a viral copy integrated into a host DNA genome. The PVL is considered to be intermediate if the proportion of infected PBMC is between 1 and 5% [19]. In the last few years, numerous studies have demonstrated a clear association between high PVL and development of HAM/TSP and of other inflammatory conditions such as infective dermatitis and keratoconjunctivitis sicca. Patients with these conditions have a PVL consistently higher than asymptomatic carriers [21, 23, 30]. Recently, our group suggested a cutoff of 5% infected cells as best the value to differentiate HAM/TSP patients from asymptomatic individuals. However, it was observed that about one third of asymptomatic individuals have PVL that exceed this this level [21].

Furthermore, the majority of infected individuals in this study presented spontaneous PBMC lymphoproliferation which was directly correlated with the PVL. Classically, the highest frequency and magnitude of proliferation are found in HAM/TSP [31, 32] although a lower frequency of infected asymptomatic individuals also presents similar levels of proliferation [13, 14].

The memory CD4⁺CD45RO⁺ T-cells are the main target for HTLV-1 infection and are preferentially involved in the spontaneous proliferation. It is estimated that the rate of proliferation of memory T-cells induced by the virus reach 3% per day [33].

The immune response is partially effective maintaining PVL stable over time, probably due to the cytotoxic response mediated by CD8⁺ T-lymphocytes that destroys infected cells. However, the immune response is unable to clearance the infection [33-35]. Regarding the subpopulation of CD8⁺ T cells, our study showed a reduced expression of CD28 in the HTLV-1-infected group, although statistically significant only in the subgroup with CPV <1% compared to healthy donors.

Low expression of CD28 on T CD8⁺ T-subset has been described primarily in patients with HAM/TSP [36]. Conversely, in other chronic or persistent infections such as schistosomiasis, Chagas' disease, and HIV infection a decrease of CD28 expression is also found [35, 37, 38].

CD28 is a costimulatory molecule expressed on T lymphocytes that interacts with natural ligands CD80 and CD86 located on antigen-presenting cells that result in cell activation. The reduction on CD28 expression found herein may represent a deactivation pathway of the immune system.

On the other hand, a fivefold increase in the frequency of regulatory T cells (CD4⁺FoxP3⁺) was observed in the group infected with HTLV-1, compared to healthy donors. These results were similar to those obtained by other studies [17, 39] indicating that the virus drives an expansion of regulatory T-cells. This expansion however would not be sufficient to control cell activation induced by the HTLV-1 infection. However, it has been reported that Forkhead box P3 (FOXP3) protein may be transiently expressed on activated T CD4⁺ cells and its expression does not necessarily convey regulatory function [40, 41]. In the present study, we were unable to evaluate the function of these cells.

In summary, the results presented herein indicate that intermediate HTLV-1 PVL is associated with activation of both CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in asymptomatic individuals. Prospective studies should be conducted to evaluate whether asymptomatic individuals with higher PVL and high immune activation are more prone to developing HTLV-1-associated diseases. The HTLV-1 PVL may be a relevant marker in monitoring asymptomatic individuals.

References

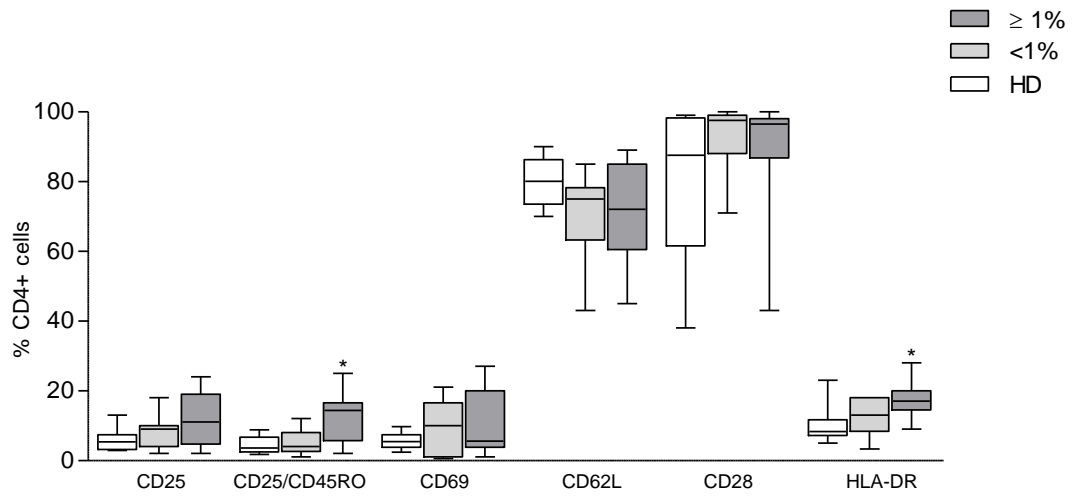
1. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC: **Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980, **77**(12):7415-7419.
2. Gessain A, Cassar O: **Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection.** *Frontiers in microbiology* 2012, **3**:388.
3. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de The G: **Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis.** *Lancet* 1985, **2**(8452):407-410.
4. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M: **HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity.** *Lancet* 1986, **1**(8488):1031-1032.
5. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y: **Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982, **79**(6):2031-2035.
6. Mochizuki M, Yamaguchi K, Takatsuki K, Watanabe T, Mori S, Tajima K: **HTLV-I and uveitis.** *Lancet* 1992, **339**(8801):1110.
7. LaGrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W: **Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection.** *Lancet* 1990, **336**(8727):1345-1347.
8. Nakada K, Kohakura M, Komoda H, Hinuma Y: **High incidence of HTLV antibody in carriers of *Strongyloides stercoralis*.** *Lancet* 1984, **1**(8377):633.
9. Marinho J, Galvao-Castro B, Rodrigues LC, Barreto ML: **Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study.** *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2005, **40**(5):625-628.
10. Bastos Mde L, Santos SB, Souza A, Finkmoore B, Bispo O, Barreto T, Cardoso I, Bispo I, Bastos F, Pereira D *et al*: **Influence of HTLV-1 on the clinical, microbiologic and immunologic presentation of tuberculosis.** *BMC infectious diseases* 2012, **12**:199.
11. Norris PJ, Hirschhorn DF, DeVita DA, Lee TH, Murphy EL: **Human T cell leukemia virus type 1 infection drives spontaneous proliferation of natural killer cells.** *Virulence* 2010, **1**(1):19-28.
12. Prince HE, York J, Owen SM, Lal RB: **Spontaneous proliferation of memory (CD45RO+) and naive (CD45RO-) subsets of CD4 cells and CD8 cells in human T lymphotropic virus (HTLV) infection: distinctive patterns for HTLV-I versus HTLV-II.** *Clinical and experimental immunology* 1995, **102**(2):256-261.
13. Mascarenhas RE, Brodskyn C, Barbosa G, Clarencio J, Andrade-Filho AS, Figueiroa F, Galvao-Castro B, Grassi F: **Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with human T-cell lymphotropic virus type 1 have a reduced capacity to respond to recall antigens.** *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2006, **13**(5):547-552.
14. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, de Jesus AR, Magalhaes E, Melo A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM: **Exacerbated inflammatory cellular immune**

- response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC infectious diseases* 2004, **4**:7.
15. Brito-Melo GE, Martins-Filho OA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares B, Ribas JG, Thorum GW, Barbosa-Stancioli EF, Grupo Interdisciplinar de Pesquisas Em H: **Phenotypic study of peripheral blood leucocytes in HTLV-I-infected individuals from Minas Gerais, Brazil.** *Scandinavian journal of immunology* 2002, **55**(6):621-628.
 16. Toulza F, Heaps A, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR: **High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response.** *Blood* 2008, **111**(10):5047-5053.
 17. Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, Tomaru U, Yao K, Grant CW, Maric DA, Jacobson S: **Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease.** *The Journal of clinical investigation* 2005, **115**(5):1361-1368.
 18. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M: **Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.** *Nature* 1995, **373**(6510):123-126.
 19. Goncalves DU, Proietti FA, Barbosa-Stancioli EF, Martins ML, Ribas JG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Peruhype-Magalhaes V, Carneiro-Proietti AB: **HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network.** *Inflammation & allergy drug targets* 2008, **7**(2):98-107.
 20. Olindo S, Lezin A, Cabre P, Merle H, Saint-Vil M, Edimonana Kaptue M, Signate A, Cesaire R, Smadja D: **HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression.** *Journal of the neurological sciences* 2005, **237**(1-2):53-59.
 21. Grassi MF, Olavarria VN, Kruschewsky Rde A, Mascarenhas RE, Dourado I, Correia LC, de Castro-Costa CM, Galvao-Castro B: **Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP.** *Journal of medical virology* 2011, **83**(7):1269-1274.
 22. Primo JR, Brites C, Oliveira Mde F, Moreno-Carvalho O, Machado M, Bittencourt AL: **Infective dermatitis and human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in childhood and adolescence.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2005, **41**(4):535-541.
 23. Castro-Lima Vargens C, Grassi MF, Boa-Sorte N, Rathsam-Pinheiro RH, Olavarria VN, de Almeida Kruschewsky R, Galvao-Castro B: **Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load.** *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2011, **52**(3):177-180.
 24. Dehee A, Cesaire R, Desire N, Lezin A, Bourdonne O, Bera O, Plumelle Y, Smadja D, Nicolas JC: **Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay.** *Journal of virological methods* 2002, **102**(1-2):37-51.
 25. Popovic M, Flomenberg N, Volkman DJ, Mann D, Fauci AS, Dupont B, Gallo RC: **Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II.** *Science* 1984, **226**(4673):459-462.
 26. Romero IAea: **Interactions between brain endothelial cells and human T-cell leukemia virus type 1-infected lymphocytes: mechanisms of viral entry into**

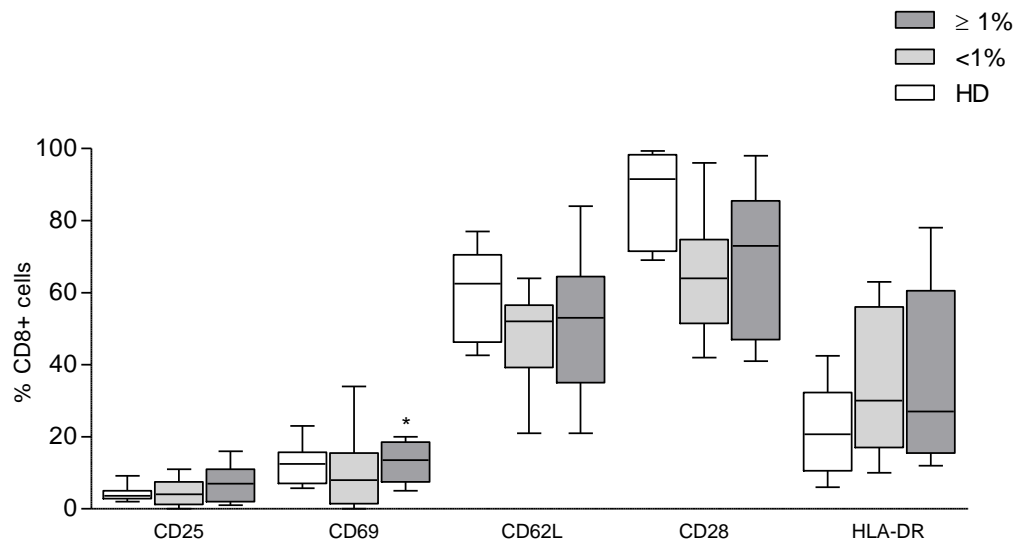
- the central nervous system. *Journal of virological methods* 2000, **74**(13):6021-6030.
27. Azimi N, Jacobson S, Leist T, Waldmann TA: **Involvement of IL-15 in the pathogenesis of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: implications for therapy with a monoclonal antibody directed to the IL-2/15R beta receptor.** *Journal of immunology* 1999, **163**(7):4064-4072.
 28. Carvalho EM, Bacellar O, Porto AF, Braga S, Galvao-Castro B, Neva F: **Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors.** *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2001, **27**(1):1-6.
 29. Nishiura Y, Nakamura T, Ichinose K, Shirabe S, Tsujino A, Goto H, Furuya T, Nagataki S: **Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy.** *The Tohoku journal of experimental medicine* 1996, **179**(4):227-233.
 30. Primo J, Siqueira I, Nascimento MC, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM, Bittencourt AL: **High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1.** *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 2009, **42**(8):761-764.
 31. Itoyama Y, Minato S, Kira J, Goto I, Sato H, Okochi K, Yamamoto N: **Spontaneous proliferation of peripheral blood lymphocytes increased in patients with HTLV-I-associated myelopathy.** *Neurology* 1988, **38**(8):1302-1307.
 32. Matsumoto M, Sugimoto M, Nakashima H, Imamura F, Kawano O, Uyama E, Takatsu K, Araki S: **Spontaneous T cell proliferation and release of soluble interleukin-2 receptors in patients with HTLV-I-associated myelopathy.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1990, **42**(4):365-373.
 33. Asquith B, Zhang Y, Mosley AJ, de Lara CM, Wallace DL, Worth A, Kaftantzi L, Meekings K, Griffin GE, Tanaka Y *et al*: **In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(19):8035-8040.
 34. Hanon E, Hall S, Taylor GP, Saito M, Davis R, Tanaka Y, Usuku K, Osame M, Weber JN, Bangham CR: **Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes.** *Blood* 2000, **95**(4):1386-1392.
 35. Caruso A, Cantalamessa A, Licenziati S, Peroni L, Prati E, Martinelli F, Canaris AD, Folghera S, Gorla R, Balsari A *et al*: **Expression of CD28 on CD8+ and CD4+ lymphocytes during HIV infection.** *Scandinavian journal of immunology* 1994, **40**(5):485-490.
 36. Brito-Melo GE, Souza JG, Barbosa-Stancioli EF, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares B, Ribas JG, Thorum GW, Rocha RD, Martins-Filho OA, Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em H: **Establishing phenotypic features associated with morbidity in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection.** *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2004, **11**(6):1105-1110.
 37. Dutra WO, Martins-Filho OA, Cancado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Gazzinelli G, Carvalho JF, Colley DG: **Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes.** *Scandinavian journal of immunology* 1996, **43**(1):88-93.

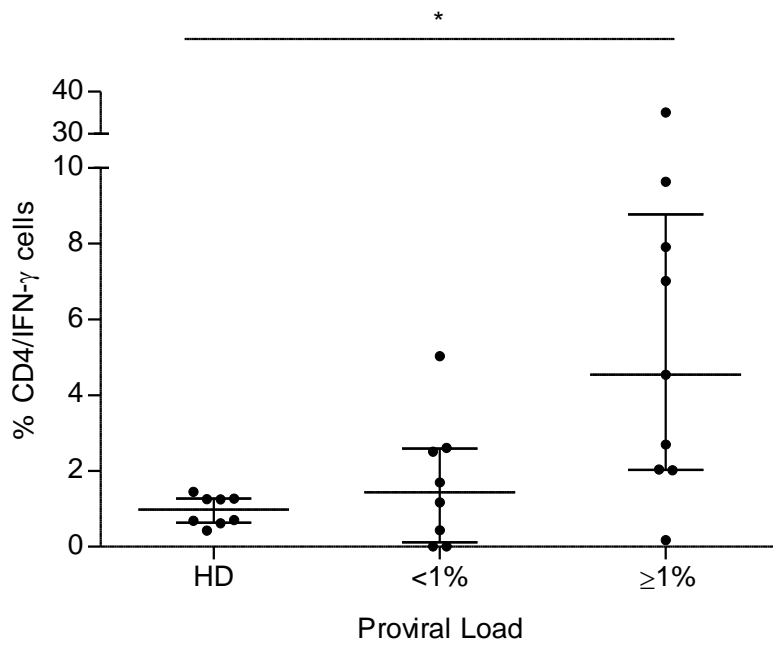
38. Martins-Filho OA, Cunha-Melo JR, Lambertucci JR, Silveira AM, Colley DG, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R: **Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules.** *Digestive diseases and sciences* 1999, **44**(3):570-577.
39. Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, Nakagawa M, Nosaka K, Matsuoka M: **HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals.** *Retrovirology* 2012, **9**:46.
40. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK: **Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production.** *International immunology* 2007, **19**(4):345-354.
41. Kmiecik M, Gowda M, Graham L, Godder K, Bear HD, Marincola FM, Manjili MH: **Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function.** *Journal of translational medicine* 2009, **7**:89.

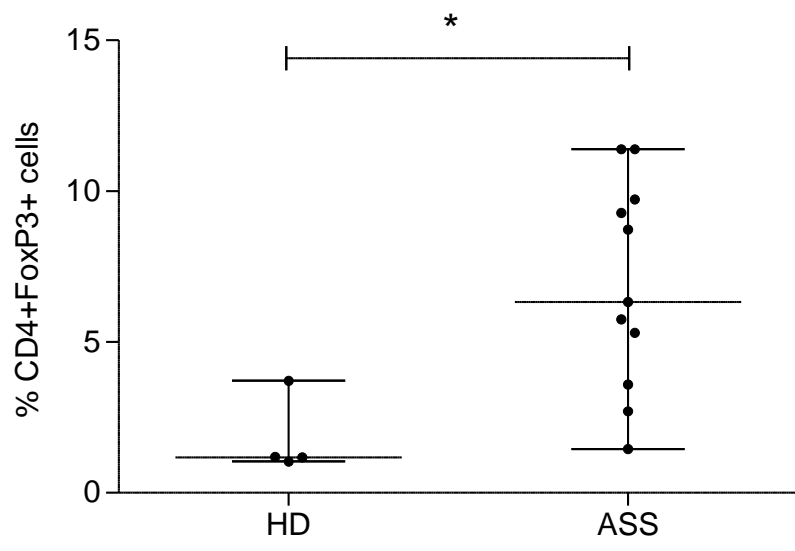
A



B







Legends

Figure 1. Activation profile of CD4+ (A) and CD8+ (B) T-lymphocytes from asymptomatic HTLV-1-infected individuals. Flow cytometry was performed using fresh whole blood samples. Data represents median and interquartile range. Asymptomatic HTLV-1-infected individuals were grouped according to HTLV-1 PVL expressed as $\geq 1\%$ and $< 1\%$ of infected cells. HD (healthy donors). Kruskal–Wallis test with the Bonferroni-Dunn multiple comparisons. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Figure 2. Intercellular detection of IFN- γ from asymptomatic HTLV-1 infected individuals. PBMCs (2×10^5 cells/well) were cultured for 18 hours. Data are presented as median (interquartile range). P-value: Kruskal–Wallis test with the Bonferroni-Dunn multiple comparisons to compare HTLV-1 PVL $\geq 1\%$ and $< 1\%$ infected cells groups and healthy donors (HD). The level of significance was set at $P < 0.05$. * $p=0.02$.

Figure 3. CD4+FoxP3+ T-cell frequency in both HTLV-1-infected and healthy donors. Data are presented as median (interquartile range). The Mann–Whitney U-test was used to compare healthy donors (HD; $n = 5$) and asymptomatic HTLV-1-infected individuals (ASS; $n = 15$). ASS individuals had PVL $< 1\%$ infected cells, except one 26% of infected cells. * $p=0.02$

Anexo 3- PHENOTYPIC PROFILE OF T-LYMPHOCYTES OF PATIENTS INFECTED WITH HUMAN T LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 1 (HTLV-1) AND DIAGNOSTIC OF POSSIBLE, PROBABLE AND DEFINITE HTLV-1-ASSOCIATED MYELOPATHY /TROPICAL SPASTIC PARAPARESIS.

PHENOTYPIC PROFILE OF T-LYMPHOCYTES OF PATIENTS INFECTED WITH HUMAN T LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 1 (HTLV-1) AND DIAGNOSTIC OF POSSIBLE, PROBABLE AND DEFINITE HTLV-1-ASSOCIATED MYELOPATHY /TROPICAL SPASTIC PARAPARESIS.

Raimundo COUTINHO JUNIOR¹, Rita Elizabeth MASCARENHAS^{1,2}; Eduardo Samogudo³, Wilson Savino⁴; Viviana Nilla OLAVARRIA², Bernardo GALVÃO-CASTRO^{1,2}& Maria Fernanda Rios GRASSI^{1,2}

1-Laboratório /CPQGM – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador- Bahia- Brazil

2- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador – Bahia – Brazil

3. Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Saúde, Maputo, Mozambique

4. Laboratório de Pesquisas sobre o Timo - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro- RJ- Brazil

Reprints or correspondence

Dr. Maria Fernanda Rios Grassi,

LASP/CPqGM/Fiocruz

Rua Waldemar Falcão, no 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40296-710, Brazil

ABSTRACT

The human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) causes the HTLV-1-Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) that affect less than 5% of infect individuals. However, HAM/TSP may be suspected in some patients but the complete diagnosis criteria are not met. The aim of this study was to characterize the cells phenotypically T lymphocyte subpopulations in asymptomatic individuals and in patients with HAM/TSP definite, probable and possible. One hundred three patients from the HTLV center of Bahiana Medicine School and Public Health (EBMSP) and 19 uninfected donors were evaluated. Patients were categorized in asymptomatic and HAM/TSP probable (Pb) e Possible (Ps) and definite (D) according to the degree of ascertainment level of HAM/TSP diagnosis. The phenotypic profile of T cell subsets was evaluated using flow cytometry. The proviral load was quantified by real time polymerase chain reaction (PCR). The proportions of TCD4⁺HLA-DR⁺ and TCD8⁺HLA-DR were significantly higher in both HAM/TSP Pb and D patients compared to asymptomatic individuals. Moreover, there was a strong positive correlation between the proportion of both T CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets and proviral load. The proportion of CD4⁺CD25⁺ T-cells was higher in the HAM/TSP-D group compared to asymptomatic individuals. In conclusion, we found that both HAM/TSP Pb and D have an activated phenotypic profile compared to asymptomatic individuals.

Keys word: HTLV, proviral load, HAM/TSP, T CD4⁺ lymphocytes, activation.

Introduction

Human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) is associated with the development of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), HTLV-1-Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) and uveitis associated with HTLV-1 (GESSAIN CASSAR, 2012). It is thought that the majority of HTLV-1-infected individuals (95-98%) remain asymptomatic during their life. However, recent evidences indicated a high frequency of neurological disorders, rheumatic and ocular manifestations in individuals considered as asymptomatic to HTLV-1-associated diseases (CASKEY, M. F. *et al.*, 2007; POETKER *et al.*, 2011). HTLV-1 is also associated with other inflammatory diseases, including arthritis (IJICHI *et al.*, 1993; MORGAN *et al.*, 1989), polymyositis and Sjögren's syndrome and Keratoconjunctivitis Sicca (EGUCHI *et al.*, 1995; MERLE *et al.*, 1996)..

The HTLV-1 infects preferentially CD4⁺ T-memory cells (CD45RO) and promotes a persistent and active infection (PRINCE *et al.*, 1995). The immunological hallmark of HTLV-1-infection is the spontaneous lymphocyte proliferation observed in the majority of infected individuals (MASCARENHAS *et al.*, 2006; PRINCE *et al.*, 1995). Higher expression of activation molecules (CD25, CD45RO, HLA-DR) in both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells and increased secretion of pro-inflammatory cytokines such as TNF-alpha (TNF- α), IFN-gamma (IFN- γ) are also described in infected patients, especially with those with HAM/TSP (CHOI *et al.*, 2002; KOHNO *et al.*, 2005; MUKAE *et al.*, 1994; YAMANO *et al.*, 2005).

One of the challenges of the clinical management of HTLV-1-infected patients with myelopathic symptoms is to establish the definite diagnosis of HAM/TSP. Current HAM/TSP diagnostic procedures are based on criteria established by the World Health Organization (WHO), which consists of a list of neurological signs and symptoms in HTLV-1 seropositive subjects. To complement WHO criteria, a new classification strategy, the Belem Criteria, based on three diagnostic ascertainment levels was proposed (DE CASTRO-COSTA *et al.*, 2006). HTLV-1- infected patients with neurological defects are categorized as: (i) Definite HAM/TSP: patients who meet the established WHO criteria with a complete clinical presentation; (ii) Probable HAM/TSP: patients with a myelopathic mono-symptomatic presentation, in which other diseases resembling HAM/TSP have been excluded; (iii) Possible HAM/TSP: patients who present with a complete or incomplete clinical picture; however, other disorders resembling HAM/TSP cannot be excluded.

The present study aimed to describe the phenotypic profile of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes from HAM/TSP Ps, Pb and D patients classified according to Belem criteria compared to asymptomatic carriers.

Methods

Subjects. HTLV-1-infected subjects were sequentially selected from the HTLV center of the Bahiana School of Medicine and Public Health (Salvador, Bahia, Brazil). They were sequentially included following a neurologic examination and were separated in four groups: asymptomatic (ASS) n=44, HAM/TSP possible (Ps) n=7, HAM/TSP probable (Pb) n=6 e HAM/TSP definite (D) n=37. The infected individuals were 19 laboratory staff volunteered as non-infected controls. All samples were screened for HTLV-1/2 antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Ab-Capture ELISA Test System – Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey), and positive results were confirmed by Western Blot (HTLV Blot 2.4, Genelabs Technologies, Singapore). Informed written consent was obtained from all enrolled individuals and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) Institutional Review Board approved this study.

Flow cytometry. 50µl of whole blood was incubated for 15 min at room temperature with anti-CD4 (BD Pharmingen Technical) and the following monoclonal antibodies: CD3, CD25, HLA-DR (BD Pharmingen Technical). Erythrocytes were subsequently lysed with FACS™ lysing solution (Becton-Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). After a final wash, cells were fixed in PBS containing 1% paraformaldehyde. Alternatively, for detection of intracellular FoxP3, 80µl of whole blood was incubated for 15 min at room temperature with anti-CD3 and CD4 monoclonal antibodies (Becton Dickinson, Mountain View, Calif.), after 15 min cells were washed twice with PBS-BSA-Saponin 0,2% and blocked with AB serum 1% for 5 min. After that, cells were incubated with anti-FoxP3 for 30 min. The cells were washed and fixed. Analyses were performed using FACSaria II (Becton Dickinson, Mountain View, Calif.) and the software FlowJo 7.5 (Tree stars, San Diego). At least 10⁵ events were analyzed per sample

Proviral load. PBMCs were obtained from EDTA blood using density gradient centrifugation and cryopreserved until use. DNA was extracted using a DNA extraction system (Qiagen, Hilden, Germany). HTLV-1 proviral load was quantified using a real-time TaqMan polymerase chain reaction (PCR) method, as previously described [24]. Briefly, SK110/SK111 primers were used to amplify a 186 bp fragment of the *pol* gene and dual TaqMan probe (50-FAM/50 VIC and 30-TAMRA) was attached at 4,829–4,858

bp of the HTLV-1 reference sequence (HTLVATK). Albumin DNA was used as an endogenous reference and HTLV-1 proviral load was calculated as the ratio of [(HTLV-1 DNA average copy number)/(albumin DNA average copy number)] x 2 x 10⁶ and expressed as the number of HTLV-1 copies per 10⁶PBMCs.

Statistical analyses. Data are expressed as median and interquartile range (25th percentile and the 75th percentile). Kruskal–Wallis non-parametric analysis of variance with the Dunn multiple comparison tests was used to compare healthy donors, with of infected patients groups. The correlations were performed by Spearman correlation test. Significant differences were considered for p <0.05. GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA) Software was used for all statistical analyses.

Results

The clinical characteristics of patients are presented in Table 1. A statistically significant difference in the proviral load was observed in HAM/TSP-D patients compared to asymptomatic individuals ($p < 0.0001$).

The expression of CD25⁺CD4⁺ T lymphocytes was similar between the groups analyzed (Figure 1). The expression of CD4⁺HLA-DR⁺ was higher in patients with HAM/TSP-Defined (median 35.2%) and Probable (median 37.7%) Possible (median 18.6%) compared to uninfected controls (median 5.78%) ($p < 0.0001$) and asymptomatic patients (median 8.9%) ($p = 0.0007$) (Figure 2A). Two patients with HAM/TSP-D had a proportion of CD4⁺HLA-DR⁺ 15 times higher than median of uninfected controls.

The frequency of CD8⁺HLA-DR⁺ T-cells was significantly higher in HTLV-1-infected patients compared with uninfected controls ($p=0.0001$). Moreover, CD8⁺HLA-DR⁺ T-cells of HAM/TSP- Pb (54%) and HAM/TSP-D (24%) was higher than to asymptomatic individuals (8.7%) ($p < 0.0001$) (Figure 2B). In addition, there was a positive correlation between the proportion of both CD4⁺HLA-DR⁺ T-cells (Spearman $r = 0.5$, $p = 0.0003$), CD8⁺HLA-DR⁺ ($r = 0.44$, $p = 0.0003$) and proviral load (Figure 2C and 2D, respectively).

The proportion of regulatory T cells (CD4⁺FoxP3⁺) was evaluated in 45 patients, 13 of these were asymptomatic, 6 HAM/TSP-Ps, 5 HAM/TSP-Pb and 21 HAM/TSP-D. Patients with HAM/TSP-D (4.6%) had a higher frequency of CD4⁺FoxP3⁺ T-cells compared to asymptomatic group (5.75%) and uninfected controls (1.2%) ($p = 0.04$) (Figure 3A). There was a positive correlation between the proportion of regulatory cells and proviral load (Figure 3B) (Spearman $r = 0.5$, $p = 0.02$).

DISCUSSION

Our results demonstrated that patients infected with HTLV-1 with HAM/TSP diagnosis present phenotypic abnormalities in T-cell that distinguish them from infected individuals without neurological symptoms. We demonstrated for the first time that the proportion of both CD4+HLA-DR+ and CD8+HLA-DR+ T-cell subsets was significantly higher in patients with HAM/TSP Pb and D compared to those of the asymptomatic individuals.

HLA-DR molecule is a MHC class II, which is expressed on the cell surface, mainly in professional antigen presenting cells (dendritic cells, macrophages and B cells). However, lymphocytes may express HLA-DR in response to a stimulus, and would be considered as an activation marker of T-cell. In HIV infection, for instance, a large expression of HLA-DR molecule is observed in both CD4+ and CD8+ activated T-cells (KELLEHER *et al.*, 1996). In these patients, increased expression of HLA-DR is straight associated with a poor prognosis. Treatment with HAART significantly reduces the expression of HLA-DR (CHOI *et al.*, 2002; XIAO *et al.*, 2011). In HTLV-1 infection, a higher expression of this molecule has also been associated with development of disease, especially with HAM/TSP. A previous study showed an increase in the percentage of CD4+HLA-DR+ T-cells in ambulatory/oligosymptomatic HAM/TSP and hospitalized HAM/TSP patients, compared with asymptomatic individuals (BRITO-MELO *et al.*, 2002). In addition, our study also found an increase in the CD8+ T-cells expressing HLA-DR in patients with HAM/TSP Ps, Pb and D compared to asymptomatic individuals (BRITO-MELO *et al.*, 2002). Furthermore, a strong correlation was observed between proportion of both CD4+ and CD8+ T-lymphocyte expressing HLA-DR+ and the proviral load. An increase in the proportion of CD4+CD25+ T-cells was also observed in patients with HAM/TSP- D compared to uninfected controls. However, patients with HAM/TSP Ps and Pb had similar levels compared to asymptomatic carriers. Although no correlation between proportion of CD25+ cells and proviral load was observed, patients with HAM/TSP had consistently higher levels of proviral load than asymptomatic individuals. Thus, the increased proportion of cells expressing CD25 may result from cellular activation secondary to stimulation caused by the persistence of the virus.

Concerning the regulatory T-cell subset, the proportion of CD4+FoxP3+T-lymphocytes was higher in both asymptomatic individuals and HAM/TSP-D patients compared with uninfected controls. Moreover, a positive correlation between proportion of regulatory T-cells and proviral load was observed. These data suggest impairment in

the function of regulatory T-cells, which lost their suppressive function. The Foxp3 protein is not exclusively present in regulatory T-cells, and may be expressed in activated T-lymphocytes (CAVATORTA *et al.*, 2012; SAKAGUCHI *et al.*, 2010). Further studies should be conducted to assess whether the function of these cells is impaired, which could not be addressed in the present study.

In our study, we observed a similar activation phenotype of both CD4+HLA-DR+ and CD8+HLA-DR+ in patients with HAM/TSP Ps, Pb and D and a direct correlation with proviral load. Patients with HAM/TSP D – according to the Belem criteria fully meet the criteria established by WHO, with a full clinical picture, while HAM/TSP-Pb correspond to patients presenting mono symptomatic myelopathy (neurogenic bladder, Babinski sign, spasticity or hyperreflexia in the lower limbs) for which other diseases resembling HAM/TSP were excluded. Yet, patients with HAM/TSP- Pb are not recognized as HAM/TSP using WHO criteria. Our results indicate that these two HAM/TSP groups (Pb and D) had similar phenotypic changes in T-lymphocytes. Regarding the group HAM/TSP-Ps, it was not possible to identify reliable alterations in the activation profile of T-lymphocytes. However, there were only few patients in this group. Recently, it was shown that patients with HAM/TSP- Ps and D had higher levels of inflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α and IFN- γ compared to asymptomatic individuals (STARLING *et al.*, 2013). In our study, we could not determine the level of plasma cytokines. However, according to the Belem criteria, HAM/TSP-Ps patients have neurological myelopathy (complete or incomplete clinical presentation) however disorders that can resemble HAM/TSP have not been excluded.

In summary, we observed that the proportion of cells expressing HLA-DR and HTLV-1 proviral load might represent markers to discriminate asymptomatic individuals from those with HAM/TSP (Possible, Probable and Defined). Further longitudinal studies should be conducted to better assess these markers.

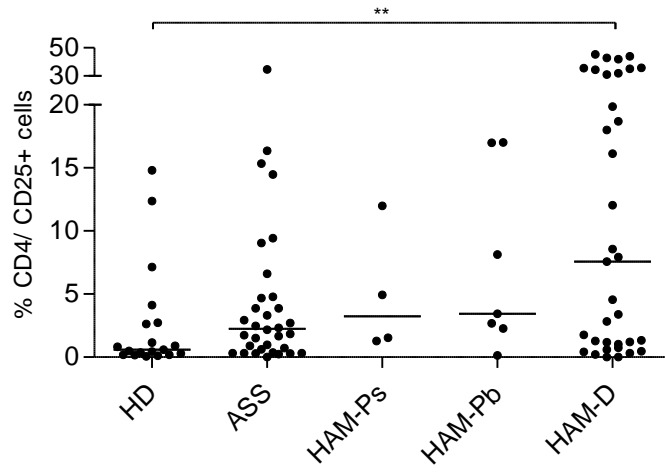
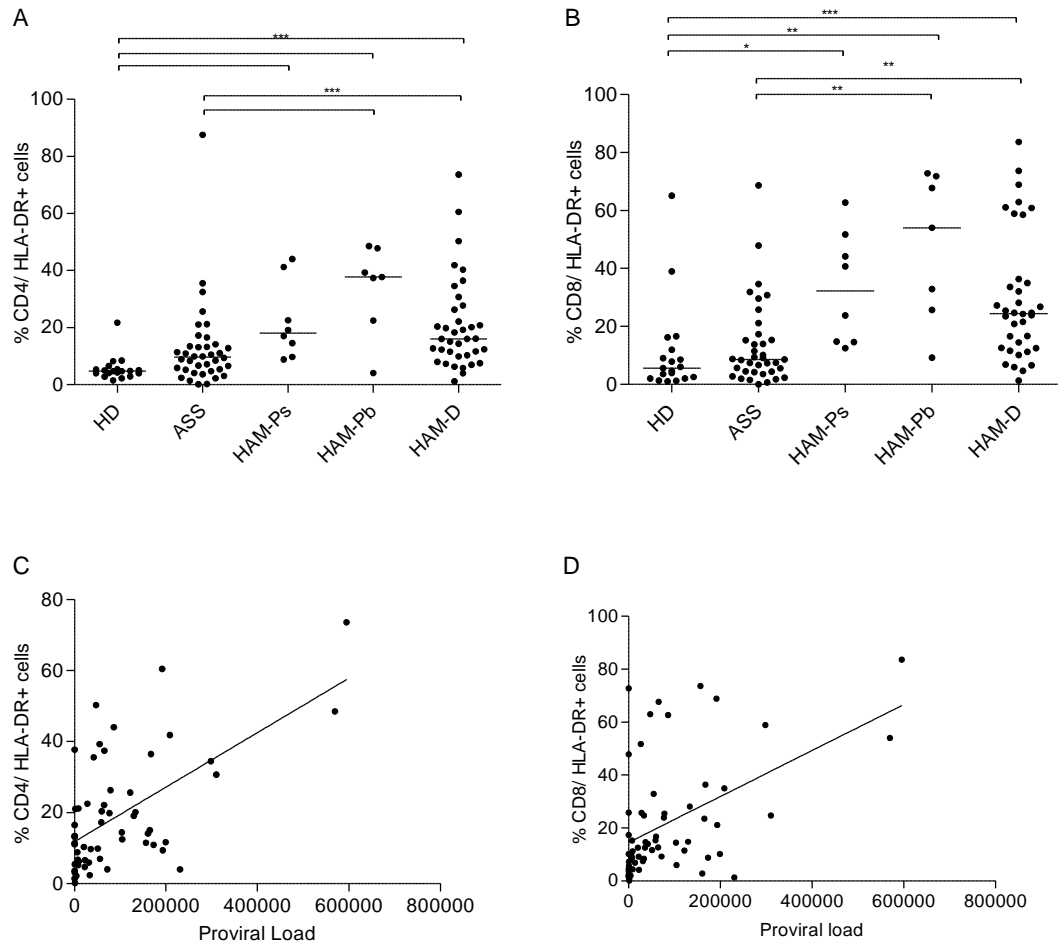


FIGURE 1

**FIGURE 2**

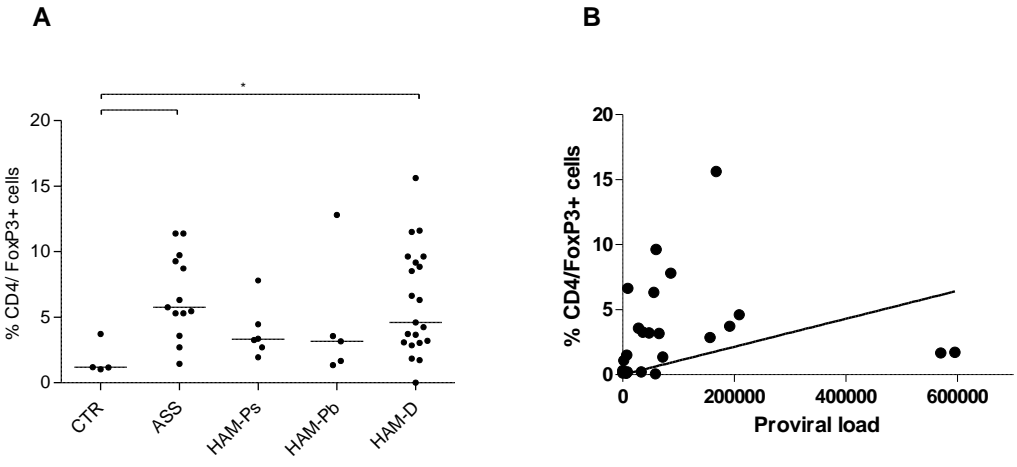


FIGURE 3

TABLE 1. Clinical Characteristics of HTLV-1 infected individuals.

Subjects	N (94)	Age	Sex	PVL		
		Mediana [min-máx]	FEM N (%)	Median	N	[min-máx]
Asymptomatic	44	41 [25-71]*	31 (80)	0.1	35	[0-6]
HAM/TSP-Possible	6	45 [36-68]	3 (60)	6	4	[2,7-13]
HAM/TSP-Probable	7	53 [30-71]	6 (86)	6	7	[2,5-57]
HAM/TSP-Definite	37	48 [32-59]	25 (68)	10.5	24	[1,4-59,5]

LEGENDS

Figure 1. Expression of CD25⁺ in Asymptomatic and HAM/TSP groups. Data represent the CD25⁺ cells in the CD4⁺ population from freshly whole blood. The Kruskal-Wallis test and Dunns post test were used to evaluate differences between the groups health controls (HD) n=19, HAM/TSP possible (HAM-Ps)n=4, Probable (HAM-Pb)n= 7 e Definite (HAM-D)n=37patients. *p=0,04.

Figura 2. Median percentage of CD4⁺ and CD8⁺/and correlation with proviral load of HTLV-1 infected individuals. Data are expressed percentage of HLA-DR on CD4⁺HLA-DR⁺(**A**) and CD8⁺HLA-DR⁺(**B**) population. Were analyzed 19 health controls (HD), n=8 HAM/TSP possible (HAM-Ps), n= 7 Probable (HAM-Pb) e n=37 Definite (HAM-D) patients. The horizontal bar represents the median. and The Spearman test was used to evaluate the correlation between the frequency of CD4⁺HLA-DR⁺ cells (**C**), CD8⁺HLA-DR⁺(**D**) and proviral load in HTLV-1-infected subjects (HD, HAM-Ps, HAM-Pb and HAM-D), (*Spearman* r=0,46, p=0,0003).

Figure 3. Proportion of CD4⁺Foxp3⁺in the subjects of the study. Data represent the Foxp3⁺ cells in the CD4⁺ population from freshly whole blood. The Kruskal-Wallis test and Dunns post test were used to evaluate differences between the groups health controls (HD) n=6, HAM/TSP possible (HAM-Ps) n=8, Probable (HAM-Pb)n= 7 e Definite (HAM-D) n=37 patients. *=0,04.

References.

Primary Sources

Secondary Sources

Uncategorized References

AKIMOTO, M., et al. Anti-HTLV-1 tax antibody and tax-specific cytotoxic T lymphocyte are associated with a reduction in HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers. *J Med Virol*, v. 79, n. 7, p. 977-86, 2007.

APPLEMAN, L. J., et al. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol*, v. 164, n. 1, p. 144-51, 2000.

ARNOLD, J., et al. Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1. *Blood*, v. 107, n. 10, p. 3976-82, 2006.

ASQUITH, B., et al. A functional CD8+ cell assay reveals individual variation in CD8+ cell antiviral efficacy and explains differences in human T-lymphotropic virus type 1 proviral load. *J Gen Virol*, v. 86, n. Pt 5, p. 1515-23, 2005.

ASQUITH, B., et al. In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 19, p. 8035-40, 2007.

AZRAN, I., et al. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology*, v. 1, p. 20, 2004.

BANGHAM, C. R.; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene*, v. 24, n. 39, p. 6035-46, 2005.

BARMAK, K., et al. Mediators of central nervous system damage during the progression of human T-cell leukemia type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol*, v. 9, n. 5, p. 522-9, 2003.

BARROS, N., et al. CD4+ T cell subsets and Tax expression in HTLV-1 associated diseases. *Pathog Glob Health*, v. 107, n. 4, p. 202-6, 2013.

BERARD, M.; TOUGH, D. F. Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology*, v. 106, n. 2, p. 127-38, 2002.

BEST, I., et al. Proviral load and immune markers associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Peru. *Clin Exp Immunol*, v. 146, n. 2, p. 226-33, 2006.

BIDDISON, W. E., et al. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. *J Immunol*, v. 159, n. 4, p. 2018-25, 1997.

BINDHU, M., et al. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. *Front Biosci*, v. 9, p. 2556-76, 2004.

BLAS, M., et al. Norwegian scabies in Peru: the impact of human T cell lymphotropic virus type I infection. *Am J Trop Med Hyg*, v. 72, n. 6, p. 855-7, 2005.

BRITES, C., et al. Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. *AIDS*, v. 16, n. 9, p. 1292-3, 2002.

BRITO-MELO, G. E., et al. Phenotypic study of peripheral blood leucocytes in HTLV-I-infected individuals from Minas Gerais, Brazil. *Scand J Immunol*, v. 55, n. 6, p. 621-8, 2002.

BRITO-MELO, G. E., et al. Establishing phenotypic features associated with morbidity in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 11, n. 6, p. 1105-10, 2004.

CASKEY, M. F., et al. Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: a cross-sectional study. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 23, n. 3, p. 365-71, 2007.

CASKEY, M. F., et al. Clinical Manifestations Associated with HTLV Type I Infection: A Cross-Sectional Study. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 23, n. 3, p. 365-37, 2007.

CATALAN-SOARES, B., et al. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saude Publica*, v. 21, n. 3, p. 926-31, 2005.

CAVATORTA, D. J., et al. Activation-induced FoxP3 expression regulates cytokine production in conventional T cells stimulated with autologous dendritic cells. *Clin Vaccine Immunol*, v. 19, n. 10, p. 1583-92, 2012.

CHEN, I. S., et al. Human T-cell leukemia virus type II transforms normal human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 80, n. 22, p. 7006-9, 1983.

CHOI, B. S., et al. The CD28/HLA-DR expressions on CD4+T but not CD8+T cells are significant predictors for progression to AIDS. *Clin Exp Immunol*, v. 127, n. 1, p. 137-44, 2002.

COELHO-DOS-REIS, J. G., et al. [Evaluation of the performance of immunological parameters as indicators for clinical progression of chronic HTLV-1 infection]. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 40, n. 1, p. 29-36, 2007.

DE CASTRO-COSTA, C. M., et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 22, n. 10, p. 931-5, 2006.

DE REVEL, T., et al. In vitro infection of human macrophages with human T-cell leukemia virus type 1. *Blood*, v. 81, n. 6, p. 1598-606, 1993.

DE SOUZA, J. G., et al. Anti-Tax antibody levels in asymptomatic carriers, oligosymptomatic carriers, patients with rheumatologic disease or with HAM/TSP do not correlate with HTLV-1 proviral load. *J Clin Virol*, 2010.

DOURADO, I., et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 34, n. 5, p. 527-31, 2003.

EGUCHI, K., et al. Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis*, v. 51, n. 6, p. 769-76, 1992.

EGUCHI, K., et al. [HTLV-I infection in primary Sjogren's syndrome--epidemiological, clinical and virological studies]. *Nihon Rinsho*, v. 53, n. 10, p. 2467-72, 1995.

FRANCHINI, G., et al. Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) transcripts in fresh and cultured cells of patients with adult T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 81, n. 19, p. 6207-11, 1984.

GAFFEN, S. L. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*, v. 14, n. 2, p. 63-77, 2001.

GALVAO-CASTRO, B., et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*, v. 37, n. 2, p. 242-3, 1997.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol*, v. 3, p. 388, 2012.

GOTUZZO, E., et al. Tropical spastic paraparesis and HTLV-I infection: clinical and epidemiological study in Lima, Peru. *J Neurol Sci*, v. 143, n. 1-2, p. 114-7, 1996.

GRASSI, M. F., et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. *J Med Virol*, v. 83, n. 7, p. 1269-74, 2011.

HANON, E. [The immune response to human T-cell lymphotropic virus type 1]. *Bull Mem Acad R Med Belg*, v. 157, n. 10-12, p. 419-24; discussion 425, 2002.

HINUMA, Y. [Adult T cell leukemia virus (ATLV)--a serological study]. *Gan To Kagaku Ryoho*, v. 9, n. 8, p. 1313-20, 1982.

HIVIN, P., et al. Interaction between C/EBPbeta and Tax down-regulates human T-cell leukemia virus type I transcription. *Virology*, v. 318, n. 2, p. 556-65, 2004.

IJICHI, S., et al. An autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: a possible pathomechanism of HAM/TSP. *Med Hypotheses*, v. 41, n. 6, p. 542-7, 1993.

IZUMO, S. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Neuropathology*, 2010.

JEFFERY, K. J., et al. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *J Immunol*, v. 165, n. 12, p. 7278-84, 2000.

JEFFERY, K. J., et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 7, p. 3848-53, 1999.

JOHANNISSON, A.; FESTIN, R. Phenotype transition of CD4⁺ T cells from CD45RA to CD45R0 is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry*, v. 19, n. 4, p. 343-52, 1995.

KALYANARAMAN, V. S., et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, v. 218, n. 4572, p. 571-3, 1982.

KAMIHIRA, S., et al. Significance of HTLV-1 proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV-1-infected cell count. *Clin Lab Haematol*, v. 25, n. 2, p. 111-7, 2003.

KAPLAN, J. E., et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 3, n. 11, p. 1096-101, 1990.

KELLEHER, A. D., et al. Alterations in the immune response of human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects treated with an HIV-specific protease inhibitor, ritonavir. *J Infect Dis*, v. 173, n. 2, p. 321-9, 1996.

KNIGHT, S. C., et al. Dendritic cells in HIV-1 and HTLV-1 infection. *Adv Exp Med Biol*, v. 329, p. 545-9, 1993.

KOENIG, S., et al. Characterization of MHC class I restricted cytotoxic T cell responses to tax in HTLV-1 infected patients with neurologic disease. *J Immunol*, v. 151, n. 7, p. 3874-83, 1993.

KOHNO, T., et al. Possible origin of adult T-cell leukemia/lymphoma cells from human T lymphotropic virus type-1-infected regulatory T cells. *Cancer Sci*, v. 96, n. 8, p. 527-33, 2005.

LA GRENADE, L. HTLV-I-associated infective dermatitis: past, present, and future. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, v. 13 Suppl 1, p. S46-9, 1996.

MACCHI, B., et al. Human Th1 and Th2 T-cell clones are equally susceptible to infection and immortalization by human T-lymphotropic virus type I. *J Gen Virol*, v. 79 (Pt 10), p. 2469-74, 1998.

MANNS, A., et al. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int J Cancer*, v. 51, n. 6, p. 886-91, 1992.

MASCARENHAS, R. E., et al. Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with human T-cell lymphotropic virus type 1 have a reduced capacity to respond to recall antigens. *Clin Vaccine Immunol*, v. 13, n. 5, p. 547-52, 2006.

MATSUOKA, M.; GREEN, P. L. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology*, v. 6, p. 71, 2009.

MATSUZAKI, T., et al. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J Neurovirol*, v. 7, n. 3, p. 228-34, 2001.

MERLE, H., et al. Sicca syndrome and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Jpn J Ophthalmol*, v. 43, n. 6, p. 509-12, 1999.

MERLE, H., et al. [Sjogren's syndrome and HTLV-I myelopathy]. *Ann Med Interne (Paris)*, v. 147, n. 8, p. 586-9, 1996.

MERLE, H., et al. [Ophthalmologic manifestations in spinal cord diseases caused by HTLV-I virus. Clinical study of 30 cases]. *J Fr Ophthalmol*, v. 17, n. 6-7, p. 403-13, 1994.

MICHEL, F., et al. CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity*, v. 15, n. 6, p. 935-45, 2001.

MOCHIZUKI, M., et al. HTLV-I uveitis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, v. 13 Suppl 1, p. S50-6, 1996.

MORGAN, O. S., et al. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet*, v. 2, n. 8673, p. 1184-7, 1989.

MUKAE, H., et al. Increase in T-cells bearing CD25 in bronchoalveolar lavage fluid from HAM/TSP patients and HTLV-I carriers. *Microbiol Immunol*, v. 38, n. 1, p. 55-62, 1994.

NAGAI, M., et al. Increased activated human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax11-19-specific memory and effector CD8⁺ cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV-I provirus load. *J Infect Dis*, v. 183, n. 2, p. 197-205, 2001.

NAGAI, M., et al. Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I Tax-specific CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. *Ann Neurol*, v. 50, n. 6, p. 807-12, 2001.

NAKADA, K., et al. High incidence of HTLV antibody in carriers of *Strongyloides stercoralis*. *Lancet*, v. 1, n. 8377, p. 633, 1984.

NAKAMURA, T. Immunopathogenesis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Ann Med*, v. 32, n. 9, p. 600-7, 2000.

NORRIS, P. J., et al. Human T cell leukemia virus type 1 infection drives spontaneous proliferation of natural killer cells. *Virulence*, v. 1, n. 1, p. 19-28, 2010.

OKAYAMA, A., et al. Increased expression of interleukin-2 receptor alpha on peripheral blood mononuclear cells in HTLV-I tax/rex mRNA-positive asymptomatic carriers. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, v. 15, n. 1, p. 70-5, 1997.

OLAVARRIA, V. N., et al. Evolution of HTLV-1 proviral load in patients from Salvador, Brazil. *Braz J Infect Dis*, v. 16, n. 4, p. 357-60, 2012.

OLINDO, S., et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. *J Neurol Sci*, v. 237, n. 1-2, p. 53-9, 2005.

OSAME, M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J Neurovirol*, v. 8, n. 5, p. 359-64, 2002.

OSAME, M., et al. HTLV-1 associated myelopathy (HAM). *Kansenshogaku Zasshi*, v. 62 Suppl, p. 240-8, 1988.

PILLET, A. H., et al. IL-2 induces conformational changes in its preassembled receptor core, which then migrates in lipid raft and binds to the cytoskeleton meshwork. *J Mol Biol*, v. 403, n. 5, p. 671-92, 2010.

POETKER, S. K., et al. Clinical manifestations in individuals with recent diagnosis of HTLV type I infection. *J Clin Virol*, v. 51, n. 1, p. 54-8, 2011.

POIESZ, B. J., et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 77, n. 12, p. 7415-9, 1980.

PRINCE, H. E., et al. Spontaneous proliferation of memory (CD45RO+) and naive (CD45RO-) subsets of CD4 cells and CD8 cells in human T lymphotropic virus (HTLV) infection: distinctive patterns for HTLV-I versus HTLV-II. *Clin Exp Immunol*, v. 102, n. 2, p. 256-61, 1995.

RICHARDSON, J. H., et al. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol*, v. 64, n. 11, p. 5682-7, 1990.

SAITO, M., et al. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology*, v. 6, p. 19, 2009.

SAKAGUCHI, S., et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, v. 10, n. 7, p. 490-500, 2010.

SANTANA, M. A.; ROSENSTEIN, Y. What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol*, v. 195, n. 3, p. 392-401, 2003.

SANTOS, S. B., et al. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC Infect Dis*, v. 4, p. 7, 2004.

SATO, T., et al. CSF CXCL10, CXCL9, and Neopterin as Candidate Prognostic Biomarkers for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7, n. 10, p. e2479, 2013.

SATOU, Y.; MATSUOKA, M. Molecular and Cellular Mechanism of Leukemogenesis of ATL: Emergent Evidence of a Significant Role for HBZ in HTLV-1-Induced Pathogenesis. *Leuk Res Treatment*, v. 2012, p. 213653, 2012.

STARLING, A. L., et al. Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Acta Trop*, v. 125, n. 1, p. 75-81, 2013.

SUGIMOTO, M., et al. Pulmonary involvement in human T-cell lymphotropic virus type-I uveitis: T-lymphocytosis and high proviral DNA load in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J*, v. 6, n. 7, p. 938-43, 1993.

SUZUKI, M., et al. Clinical significance of CD45RO expression on peripheral blood mononuclear cells in HTLV-I-infected individuals. *Br J Haematol*, v. 92, n. 2, p. 401-9, 1996.

TAKENOUCI, N., et al. Usefulness of Proviral Load Measurement for Monitoring of Disease Activity in Individual Patients with Human T-Lymphotropic Virus Type I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Journal of Neurovirology*, v. 9, n. 1, p. 29-35, 2003.

TAYLOR, G. P. Pathogenesis and treatment of HTLV-I associated myelopathy. *Sex Transm Infect*, v. 74, n. 5, p. 316-22, 1998.

TR, M., et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.*, v. 136, n. 7, p. 2348-57, 1986.

UCHIYAMA, T., et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*, v. 50, n. 3, p. 481-92, 1977.

URETA-VIDAL, A., et al. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. *Int J Cancer*, v. 82, n. 6, p. 832-6, 1999.

USUI, T., et al. Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. *Retrovirology*, v. 5, p. 34, 2008.

VERDONCK, K., et al. HTLV-1 infection is frequent among out-patients with pulmonary tuberculosis in northern Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 11, n. 10, p. 1066-72, 2007.

WATANABE, T., et al. HTLV type I (U. S. isolate) and ATLV (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. *Virology*, v. 133, n. 1, p. 238-41, 1984.

WOLFE, N. D., et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 22, p. 7994-9, 2005.

XIAO, J., et al. HLA-DR expression on regulatory T cells is closely associated with the global immune activation in HIV-1 infected subjects naive to antiretroviral therapy. *Chin Med J (Engl)*, v. 124, n. 15, p. 2340-6, 2011.

YAKOVA, M., et al. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirology*, v. 2, p. 4, 2005.

YAMANO, Y., et al. Increased expression of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) Tax11-19 peptide-human histocompatibility leukocyte antigen A*201 complexes on CD4⁺ CD25⁺ T Cells detected by peptide-specific, major histocompatibility complex-restricted antibodies in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *J Exp Med*, v. 199, n. 10, p. 1367-77, 2004.

YAMANO, Y., et al. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood*, v. 99, n. 1, p. 88-94, 2002.

YAMANO, Y., et al. Virus-induced dysfunction of CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J Clin Invest*, v. 115, n. 5, p. 1361-8, 2005.

YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol*, v. 19, p. 475-96, 2001.